

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. T. Schwarz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# **Untersuchungen zur Induktion antimikrobieller Proteine in Keratinozyten durch Zytokin-Kombinationen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

HANNA MARIA SCHUMACHER

aus Düsseldorf

Kiel 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Harder
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rainer Podschun
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	05.04.2011
gez.	Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

---

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Chemikalien .....	6
2.1.2 Enzyme .....	6
2.1.3 Oligonukleotide (Primer).....	7
2.1.4 Antikörper für ELISA .....	7
<b>2.2 Isolierung und Kultivierung humaner Keratinozyten .....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Anzucht und Isolierung humaner Keratinozyten .....	8
2.2.2 Kollagenisierung von Kulturflaschen und Kulturplatten .....	8
2.2.3 Subkultivierung humaner Keratinozyten.....	9
2.2.4 Stimulation humaner Keratinozyten .....	9
<b>2.3 Proteinanalytik mittels ELISA .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Durchführung .....	10
<b>2.4 Quantitative RT- PCR.....</b>	<b>11</b>
2.4.1 RNA–Isolierung.....	11
2.4.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	11
2.4.3 Reverse Transkription (RT) von RNA (cDNA Synthese) .....	11
2.4.4 „Real Time“- RT-PCR .....	12
<b>2.5 Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>13</b>
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 RNase 7 .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Induktion von RNase 7 durch Zytokine .....	14
<b>3.2 hBD-2 .....</b>	<b>17</b>

---

3.2.1 Induktion von hBD-2 durch Zytokine .....	17
3.3 hBD-3 .....	20
3.3.1 Induktion von hBD-3 durch Zytokine .....	20
3.4 Psoriasin .....	21
3.4.1 Induktion von Psoriasin durch Zytokine .....	22
4 Diskussion .....	24
4.1 Untersuchte AMP der Haut .....	24
4.2 Verwendete Zytokine .....	25
4.3 Signalvermittlung über Transkriptionsfaktoren .....	27
4.4 Klinischer Bezug .....	28
4.5 Ausblick .....	32
Abkürzungsverzeichnis .....	35
Literaturverzeichnis .....	38
Lebenslauf .....	50

# 1 Einleitung

Alle Organismen sind in ihrer Umwelt verschiedensten Einflüssen ausgesetzt. Die erste Grenzfläche auf die diese chemischen, physikalischen oder biologischen Einflüsse beim Menschen bzw. bei Mehrzellern oder Wirbeltieren treffen, ist das Epithel. Es ist daher nicht überraschend, dass die Epithelien, wie zum Beispiel die Haut, im Laufe der Evolution viele Abwehr- und Schutzmechanismen gegen äußere, potentiell schädliche Wirkstoffe und Mikroorganismen entwickelt haben.

Vor allem Mikroorganismen (Viren, Bakterien und Pilze) finden auf der Haut in vielen Fällen die für sie optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit, Nährstoffangebot). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass sich auf der Oberfläche der obersten Hautschicht (Stratum corneum) und innerhalb der äußeren Epidermisschichten je nach Körperregion eine mikrobielle Hautflora mit  $10^2 - 10^7$  Mikroorganismen/cm<sup>2</sup> findet. Verglichen mit dieser hohen Besiedelungsrate von Mikroorganismen ist die Rate der Hautinfektionen gering (Elias et al. 2003). Eine Erklärung hierfür bietet die physikalische Barriere, welche zur Wahrung der Integrität der Haut beiträgt. Durch die ständige Desquamation des Stratum corneum wird ein Teil der Keime einfach mechanisch entfernt. Neben der physikalischen Barriere tragen auch der niedrige pH-Wert der Haut („Säureschutzmantel“) (Fischer 1959, Elias 2007), sowie die sogenannte „Lipidbarriere“ (Miescher 1960, Elias 2007), bestehend aus langkettigen Fettsäuren, zur Barrierefunktion der Haut bei. Es ist allerdings auch nachgewiesen worden, dass diese Barrieren alleine nicht ausreichen, um den Körper hinreichend vor Überbesiedelung und Schädigung durch Mikroorganismen zu schützen (Weinberg und Swartz 2003).

In den letzten Jahrzehnten hat sich herausgestellt, dass Mehrzeller in der Lage sind „körpereigene Antibiotika“ zu produzieren. Diese Proteine werden als antimikrobielle Proteine (AMP) bezeichnet (Ganz et al. 1985). Heute ist bekannt, dass Keratinozyten, die dominanten Zellen der Epidermis, in der Lage sind, AMP und Zytokine freizusetzen (Kim und Modlin 2003).

1987 beschrieb M. Zasloff Peptide, welche schon in geringen Konzentrationen antibakterielle und antimykotische Wirkung aufwiesen. Diese hatte er aus der Haut eines Frosches (*Xenopus laevis*) isoliert: die Magainine (Zasloff 1988). Weitere AMP wurden später auch bei Insekten, Amphibien und Säugetieren gefunden (Schröder

1999, Hetru et al. 2003, Bomann 2003). Diese Entdeckungen legten die Vermutung nahe, dass auch im menschlichen Gewebe AMP vorhanden sind.

Das erste in der menschlichen Haut beschriebene AMP war das Lysozym (Ogawa et al. 1971), das antimikrobielle Aktivität sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Keime besitzt.

Neben ihrer direkten antimikrobiellen Aktivität sind AMP außerdem in der Lage, Mechanismen der zellulären und der adaptiven Immunabwehr zu aktivieren und somit Entzündungsreaktionen zu alternieren (Braff et al. 2005).

Mittlerweile wurde ein Vielzahl an AMP in diversen Organismen identifiziert (eine Übersicht bietet folgende Datenbank: „The Antimicrobial Peptide Database“, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Wichtige AMP in Säugetieren und beim Menschen sind unter anderem die Defensine, die Ribonukleasen und die S100-Proteine. Defensine sind kleine (3 - 5 kDa), kationische, arginin- und lysinreiche Peptide mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und sechs charakteristischen Cysteinresten, die drei Disulfidbrücken bilden. Je nach Anordnung der Disulfidbrücken lassen sich die Defensine in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine einteilen (Ganz 2003).

Bestimmte  $\alpha$ -Defensine (HNP 1 - 4) finden sich größtenteils in neutrophilen Granulozyten (Yang 1999), daher auch die Bezeichnung HNP (= „human neutrophil peptide“). HNP 1 - 4 weisen ein breites antimikrobielles Spektrum und ebenfalls antivirale Aktivität auf (Bomann 2003, Cunliffe 2003, Ganz 2003). Weiterhin wirken sie chemotaktisch auf T-Zellen, dendritische Zellen sowie auf Monozyten (Yang 1999, Harder et al. 2007). Die humanen  $\alpha$ -Defensine HD 5 und HD 6 werden hauptsächlich in intestinalen Paneth-Zellen gebildet und scheinen dort vor enterischen Infektionen zu schützen (Cunliffe 2003).

Die humanen  $\beta$ -Defensine (hBD) werden in verschiedenen Epithelien produziert. Das erste 1995 isolierte humane  $\beta$ -Defensin war hBD-1, welches sich u. a. in Keratinozyten, Atemwegsepithelien und Epithelien des Urogenitaltraktes findet (Bensch et al. 1995). Es ist ein konstitutiv exprimiertes, nicht induzierbares Peptid mit relativ schwacher bakterizider Wirkung (außer gegen *E. coli*) im Vergleich zu hBD-2 und hBD-3 (Schröder 2002). Es spielt allerdings eine Rolle als Tumorsuppressor-Gen bei Tumoren des Urogenitaltraktes und weist chemotaktische Aktivität über den „CC-Chemokine receptor 6“ (CCR 6) auf, ein Rezeptor, der ebenfalls von Zellen der adaptiven Immunantwort exprimiert wird (Sun et al. 2006, Wenghoefer et al. 2008, Bullard et al. 2008).

Das humane  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) wird in gesunder Haut in relativ geringem Ausmaß exprimiert und wurde 1997 als erstes induzierbares AMP des Menschen identifiziert (Harder et al. 1997). Es wurde erstmalig aus Hautläsionen von Psoriasis vulgaris-Patienten gewonnen. Schon seit 1978 ist bekannt, dass Patienten, die an Psoriasis vulgaris leiden, trotz ihrer multiplen Hautläsionen nicht häufiger von Hautinfektionen betroffen sind als Gesunde (Singh und Rao 1978, Henseler und Christophers 1995). Weiterhin entdeckten Singh und Rao, dass sich qualitativ kein Unterschied zwischen den Bakterienstämmen der Psoriasisläsionen und der gesunden Haut feststellen ließ. Quantitativ ließ sich feststellen, dass die nicht-läsionale Haut des Psoriasis-Patienten mehr Bakterien aufwies, die Plaques hingegen signifikant weniger (Singh und Rao 1978). HBD-2 wird von den meisten Epithelien des Menschen gebildet (Bals et al. 1998, Singh et al. 1998, Krisanaprakornkit et al. 2000, Nitschke et al. 2002, Wehkamp et al. 2002, McDermott et al. 2003, Chung und Dale 2004). Es besitzt hohe antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Hefen sowie gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, wirkt jedoch in hohen Konzentrationen (100  $\mu\text{g/ml}$ ) nur bakteriostatisch gegen den grampositiven Erreger *Staphylococcus aureus* (Schröder und Harder 2006).

Interessanterweise ist die antimikrobielle Aktivität von hBD-2 stark von der Salzkonzentration des umgebenden Milieus abhängig. Je höher die NaCl-Konzentration, desto schlechter ist die antimikrobielle Wirkung (Bals et al. 1998). Ebenfalls ist mittlerweile bekannt, dass die Expression von hBD-2 durch Rhinoviren induziert wird und dass hBD-2 in der Lage zu sein scheint, die Replikation des HI-Virus 1 zu hemmen (Quinones-Mateu et al. 2003). Wie hBD-1 ist hBD-2 außerdem in der Lage, dendritische Zellen und Mastzellen durch Chemotaxis über den CCR6-Rezeptor an den Ort eines entzündlichen Geschehens zu rekrutieren (Yang et al. 1999, Harder et al. 2007). Die Expression von hBD-2 ist abhängig vom Reifestadium der Keratinozyten und ist durch Zytokine wie Interleukin (IL) -1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$  („tumor necrosis factor-alpha“) und Bakterien induzierbar (Harder 1997, Liu et al. 2002, Liang 2006).

Das induzierbare AMP humanes Beta-Defensin-3 (hBD-3) wurde ebenfalls erstmalig aus Psoriasisläsionen gewonnen. Es besitzt die typische  $\beta$ -Defensin-Struktur mit sechs Cysteinresten. Es kommt insbesondere in Keratinozyten und Epithelien der Atemwege vor, und seine Expression in Keratinozyten ist durch TNF- $\alpha$  und Bakterien

induzierbar. HBD-3 ist wirksam gegen die Hefe *C. albicans* sowie gegen viele potentiell pathogene Bakterien wie *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, und sogar gegen MRSA („methicillin resistant *S. aureus*“) und VRE („vancomycin resistant *Enterococcus faecium*“) ist eine bakterizide Wirkung nachgewiesen worden (Harder et al 2001, Schneider et al. 2005). Es scheint ebenfalls eine Rolle bei der viralen Abwehr zu spielen, beschrieben wurde eine inhibierende Wirkung auf das Herpes-simplex-Virus (HSV) (Hazrati et al. 2006) und auf die HIV- Replikation (Quinones-Mateu et al. 2003).

Das AMP Psoriasin (S100A7) gehört zu der Familie der S100-Proteine. S100-Proteine zeigen in der Regel Gewebsspezifität und werden zelltypisch exprimiert (Marenholz et al. 2004). Psoriasin besitzt das spezifische, kalziumbindende Aminosäuremotiv EF-Hand (Eckert und Lee 2006) und wird in Keratinozyten, Sebozyten und Epithelien des Urogenitaltraktes konstitutiv exprimiert. Tatsächlich wird es in Regionen des Körpers, auf deren Oberflächen sich eine höhere bakterielle Besiedelung (z. B. Kopf, Axilla, Handinnenflächen) befindet, stärker exprimiert als in Regionen mit niedriger Besiedelung (z. B. Handrücken oder Schienbein) (Gläser et al. 2005). Psoriasin zeigt schon in niedrigen Konzentrationen hohe antimikrobielle Aktivität gegen *E. coli*. Es entfaltet seine Aktivität unabhängig von der NaCl-Konzentration und ist sowohl in pH-neutralem als auch in saurem Milieu gleichermaßen aktiv (Gläser et al. 2005). Eine Überexpression von Psoriasin findet man bei Entzündungen, hyperproliferativen Hauterkrankungen und sogar bei malignen Hauttumoren (Eckert und Lee 2006).

Eine weitere wichtige Gruppe der AMP sind die Ribonukleasen. Vor allem RNase 7 weist extrem hohe antimikrobielle Aktivität schon in geringen Konzentrationen gegen sowohl gramnegative (*E. coli*, *P. aeruginosa*) als auch grampositive (*S. aureus*, *Propionibacterium acnes*) Bakterien und die Hefe *C. albicans* auf. Besonders bakterizid scheint es auf VRE zu wirken (Harder und Schröder 2002, Zhang 2002). RNase 7 ist ein basisches Protein (pH 9,8), welches vier Disulfidbrücken beinhaltet und wie Psoriasin, aber im Gegensatz zu hBD-2 und hBD-3, auch in gesunder Haut konstitutiv in relativ hoher Konzentration exprimiert zu werden scheint. Bekannte Induzierbarkeit besteht durch IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Bakterien (Schröder und Harder 2005). RNase 7 wird vornehmlich in Keratinozyten exprimiert, findet sich aber auch in Epithelien der Atemwege und des Urogenitaltraktes (Schröder 2002, Harder und Schröder 2005, Schröder und Harder 2006).



---

Da sich die Expression der oben erwähnten AMP in Keratinozyten durch Zytokine induzieren lässt und diese *in vivo* normalerweise nicht isoliert vorkommen, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine Kombination von Zytokinen zu einer vermehrten Expression von AMP führt. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Kombination von IFN- $\gamma$  und IL-17 schon in geringen Konzentrationen zu einer synergistischen, sehr hohen Induktion von verschiedenen AMP in Keratinozyten führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1 Chemikalien

5 x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
ABTS	Roche, Mannheim
Aqua Spüllösung	Deltaselect GmbH, Pfullingen
Bovines Kollagen	BD Biosciences, Bedford, USA
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
DMEM	Cellconcepts, Umkirch
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Gibco, Eggenstein
Epilife Medium	Cascade Biologics, Portland, USA
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz
H <sub>2</sub> O	Promochem GmbH, Wesel
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
Streptavidin-POD-Konjugat	Roche, Mannheim
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden über Merck (Darmstadt) oder Sigma-Chemie (Deisenhofen) bezogen.

#### 2.1.2 Enzyme

Light Cycler-FastStart DNA Master	
SYBR GreenI	Roche Diagnostics, Mannheim
Superscript SSII RT	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Premix Ex Taq	Qiagen, Hilden

### 2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Gen- mRNA	Primer	Sequenz
GAPDH	GA-1	5`-CCAGCCCGACCACATCGCTC-3`
GAPDH	GA-2	5`-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3`
Psoriasin	vo- r1	5`-TGTCCTTTTTCTCAAAGACGTC-3`
Psoriasin	vo- f1	5`-AGACGTGATGACAAGATTGAC-3`
RNase 7	S2-33	5`- CATGGCTGAGTTGCATGCTTGA-3`
RNase 7	S2-31	5`- GGAGTCACAGCACGAAGACC-3`
hBD-2	for-1	5`-GCCTCTTCCAGGTGTTTTTG-3`
hBD-2	ra	5`-GAGACCACGGTGCCAATTT-3`
hBD-3	S3-13	5`-CTTCGGCAGCATTTTCGGCCA-3`
hBD-3	S3-17	5`-AGCCTAGCAGCTATGAGGATC-3`
LL-37	f	5`-CACCGCTTCACCAGCCC-3`
LL-37	r1	5`-TGGGTACAAGATTCCGCAAA-3`
-	(oligo-)dT	(T) <sub>18</sub>

### 2.1.4 Antikörper für ELISA

#### RNase 7

im Hause hergestellt (Köten et al. 2009)

1. Antikörper: Polyklonaler Ak aus Ziege, Verdünnung 1:1000
2. Antikörper: Biotinylierter Ak, Verdünnung 1:7500

#### hBD-2

1. Antikörper: Polyklonaler Ak, PeproTech, Rocky Hill, USA  
Verdünnung 1:2000
2. Antikörper: Biotinylierter Ak, Cell Concepts, Umkirch  
Verdünnung 1:500

### **Psoriasis**

im Hause hergestellt (Gläser et al. 2005)

1. *Antikörper:* Monoklonaler Ak (Klon HL15-4)  
Verdünnung: 1:7500
2. *Antikörper:* Biotinylierter Ak, (Klon HL44-8)  
Verdünnung: 1:8000

## **2.2 Isolierung und Kultivierung humaner Keratinozyten**

### **2.2.1 Anzucht und Isolierung humaner Keratinozyten**

Die verwendeten humanen Keratinozyten wurden aus frischen infantilen Vorhäuten, welche aus chirurgisch indizierten Zirkumzisionen stammten, gewonnen. Die Vorhäute wurden von Fett und Bindegewebe befreit und in schmale Streifen geschnitten (ca. 2 x 5 mm). Anschließend erfolgte die mechanische Trennung der Epidermis von der Dermis nach Inkubation über Nacht bei 4 °C in 25 ml 0,25 %iger Trypsinlösung. Durch vorsichtiges Abschaben wurden die Keratinozyten von den anderen Zellschichten gelöst. Nach Resuspension und Zentrifugation (5 min, 800 g) erfolgte das Aussäen in Zellkulturflaschen mit 10 ml EpiLife- Medium. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Lebenszeit der Keratinozyten ließ etwa drei bis vier Subkultivierungen zu, wobei die Zellen schon bei niedriger Konfluenz passagiert wurden, um eine schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern.

### **2.2.2 Kollagenisierung von Kulturflaschen und Kulturplatten**

Da Keratinozyten adhärentes Wachstumsverhalten zeigen und Adhäsionsproteine produzieren, die sich an andere Keratinozyten, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran anheften, wurden alle für Kultur und Stimulation verwendeten Zellkulturflaschen und 12-Loch-Platten zur besseren Adhärenz der Keratinozyten kollagenisiert. Kollagen ist wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Für die Beschichtung diente bovines Kollagen (2,9 mg/ml; BD Biosciences, Bedford, USA) 1 %ig in HCl gelöst. Die Zellkulturflaschen wurden mit je

5 ml, die 12-Loch-Platten mit je 0,5 ml pro Vertiefung befüllt und nach 3-stündiger Inkubation bei 37 °C zweimalig mit PBS gewaschen.

### **2.2.3 Subkultivierung humaner Keratinozyten**

Die Subkultivierung der humanen Keratinozyten erfolgte bei ca. 80 % Konfluenz und je nach Ausdifferenzierung.

Die Keratinozyten wurden zunächst mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation bei 37 °C für 5 - 7 Minuten unter Zugabe einer 0,1 % Trypsin-0,02 % EDTA-Lösung. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Klopfen an der Zellkulturflasche, wobei das Ausmaß der Zellablösung regelmäßig mikroskopisch kontrolliert wurde.

Durch anschließende Zugabe von 10 ml DMEM mit 10% FCS wurde die Trypsin-bedingte enzymatische Proteolyse gestoppt und die Zellen bei 800 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Zellpellet in 6 ml EpiLife resuspendiert, verdünnt und anschließend entweder in sterile Zellkulturflaschen eingesät (Subkultivierung) oder zur Stimulation in 12-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt.

### **2.2.4 Stimulation humaner Keratinozyten**

Die zu stimulierenden Zellen wurden vor Beginn einer Stimulation in 12-Loch-Platten (1 ml Zellsuspension pro Vertiefung) gegeben. Eine Stimulation mit den entsprechenden Substanzen erfolgte bei etwa 80 % Konfluenz. Als Stimuli wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\alpha$  eingesetzt (PeproTech, Hamburg). Der jeweilige Stimulus wurde in Keratinozytenmedium mit 0,1 % Albumin (BSA) aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Das BSA sollte eine mögliche unspezifische Wechselwirkung der Stimulussubstanz mit der Wand der Lochplatte und somit eine Verringerung der effektiven Stimuluskonzentration verhindern.

Die Stimulationszeit betrug je Versuch ca. 16 Stunden. Die Zellen wurden anschließend für die RNA-Isolierung verwendet (s. 2.4.1). Die Überstände wurden jeweils abgenommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

## 2.3 Proteinanalytik mittels ELISA

Für die Detektion und Bestimmung von RNase 7, Psoriasin und hBD-2 in den abgenommenen Überständen wurde ein ELISA ("enzyme-linked immunoabsorbent assay") durchgeführt. Spezifische primäre Antikörper binden dabei an den nachzuweisenden Stoff (= Antigen). Mit Hilfe sekundärer biotinylierter Antikörper und des an Streptavidin gekoppelten Enzyms Peroxidase wird später eine Farbreaktion ausgelöst, deren Intensität proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Proteins ist.

### 2.3.1 Durchführung

Für alle durchgeführten ELISA Untersuchungen wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc Immuno Plate Maxisorp, Nunc GmbH, Wiesbaden) verwendet. Jede Vertiefung wurde mit entsprechendem ersten Antikörper (s. 2.1.4), welcher in 50 µl 0,05 M Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) auf 1 ng/µl verdünnt war, beschichtet und 1 h schüttelnd (300 Upm) bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit des ersten Antikörpers erfolgte eine Absättigung unspezifischer Proteinbindungen durch eine 10 minütige Inkubation mit PBS/1 % BSA bei 37 °C. Danach wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit Waschpuffer (0,01 % Tween 20 in PBS) gespült. Auf die Platten wurden dann neben einem Leerwert je 50 µl der zu testenden Überstände und eine jeweilige Konzentrationsreihe (RNase 7: 0,3 ng/ml - 40 ng/ml; Psoriasin: 0,6 ng/ml - 30 ng/ml; hBD-2: 0,3 ng/ml - 20 ng/ml) als „Standards“ gegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurde der biotinylierte Antikörper (s. 2.1.4) verdünnt in Waschpuffer aufgetragen (je 50 µl pro Kavität), wiederum 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Als nächstes wurden 50 µl Streptavidin (Peroxidase-konjugierter Avidin Komplex, Roche Diagnostics, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers pro Vertiefung aufgetragen und ebenfalls 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Mikrotiterplatte erfolgte das Auftragen von 50 µl ABTS (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure) pro Vertiefung als Entwicklungsreagenz. Nach ca. 15 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Färbereaktion durch Messung der Absorption bei 405 nm

(Referenzwellenlänge 492 nm) in einem Multikanal Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) bestimmt.

## **2.4 Quantitative RT- PCR**

### **2.4.1 RNA–Isolierung**

Die RNA-Isolierung aus den stimulierten Keratinozyten erfolgte mit dem TRIzol™ Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde mit 20 - 25 µl 25 %iger Formamidlösung resuspendiert und entweder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren oder direkt verarbeitet.

### **2.4.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung der RNA aus den Keratinozyten erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung. Die Messung erfolgte mittels eines UV-Detektors mit automatischer Quantifizierung (Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm (A<sub>260</sub>). Eine A<sub>260</sub> Extinktion von 1 entspricht dabei einer RNA- Konzentration von 41,2 µg/ml (Sambrook und Gethin 1989).

### **2.4.3 Reverse Transkription (RT) von RNA (cDNA Synthese)**

Zur weiteren Analyse wurde die zuvor gewonnene RNA in stabilere cDNA (= komplementäre DNA) umgeschrieben. Bei diesem Prozess nutzt man das Enzym Reverse Transkriptase, welches über die RNA eine komplementäre DNA synthetisiert.

Für einen Reaktionsansatz wurden 1 µg RNA und 1,5 µl Oligo dT (20 µM) mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 12,5 ml gebracht. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 70 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Nach Abkühlen auf 42 °C wurden hinzugefügt:

4,0 µl 5x Reaktionspuffer

2,0 µl DTT (0,1 M)

1,0 µl dNTP (10 mM)

0,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Invitrogen)

Die reverse Transkription erfolgte für 1 Stunde bei 42 °C und wurde anschließend bei 90 °C für 5 Minuten beendet (Inaktivierung des Enzyms). Die dabei gewonnene cDNA wurde mit 80 µl reinem HPLC-H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.4.4 „Real Time“- RT-PCR**

Die Kombination der Reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht es, die Genexpression auf mRNA- Ebene zu untersuchen und darzustellen. Vorteil dieser Methode ist, dass auch mRNA Moleküle, die nur in geringer Konzentration vorkommen, nachgewiesen werden können.

Die cDNA wurde mit zwei genspezifischen Primern amplifiziert, wobei Intron-überspannende Primer verwendet wurden, um cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können. Um einen internen Standard zu ermitteln, wurden Primer verwendet, die ein spezifisches, 360 bp großes Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) amplifizieren. Diese wird in Keratinozyten konstant exprimiert. Die entsprechenden Sequenzen sind in 2.1.3 angegeben. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem „real-time“-PCR-Gerät (Light cycler, Roche Diagnostics, Mannheim). Es wurden je 1 µl cDNA (entsprechend 10 ng revers transkribierter RNA) in folgendem Ansatz pro Probe eingesetzt:

3,6 µl H<sub>2</sub>O

5,0 µl SYBR Takara Mix

Je 0,2 µl 10 µM Primer (s. 2.1.3)



Das für die PCR benutzte Temperaturprofil bestand nach einer initialen Denaturierungszeit (10 Minuten bei 95 °C) aus einer 45-fachen Wiederholung des folgenden Zyklus:

95 °C für 10 s

68 °C für 5 s

72 °C für 10 s

Die primerspezifische Start-„Annealing“-Temperatur (68 °C) wurde pro Zyklus um 1 °C bis auf 60 °C (End-„Annealing“-Temperatur) verringert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte jeweils bei 72 °C am Ende eines Zyklus.

Durch eine Schmelzkurvenanalyse wurde die Spezifität der PCR Produkte überprüft. Danach konnte mit Hilfe von zuvor für jedes Primerpaar erstellten Standardkurven die spezifischen Transkriptmengen bestimmt und somit im Abgleich mit den jeweiligen GAPDH- Transkriptmengen die relative mRNA-Expression berechnet werden.

## **2.5 Darstellung der Ergebnisse**

Die dargestellten Diagramme zu den Experimenten mit Keratinozyten im Ergebnisteil dieser Arbeit stellen, soweit nicht anders erwähnt, repräsentative Beispiele von mehrfach durchgeführten, unabhängigen Versuchen dar, die vergleichbare Resultate lieferten. Versuche die in Wiederholungen keine eindeutigen bzw. abweichende Resultate aufwiesen, fanden in dieser Arbeit keine Berücksichtigung. Die entsprechende Stimuluskonzentration ist aufgrund unterschiedlicher Versuchsreihen jeweils unter jeder Abbildung angegeben.

Die angegebenen Messwerte entsprechen, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Die Standardabweichungen der Messwerte sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

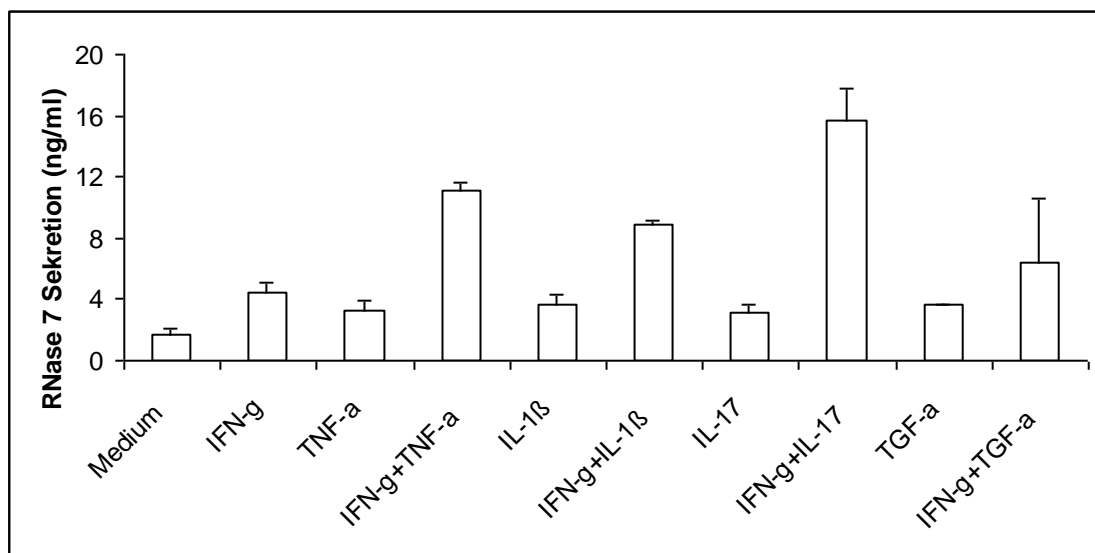
## 3 Ergebnisse

### 3.1 RNase 7

RNase 7 ist eines der dominierenden AMP der Haut (Harder und Schröder 2002). Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, weitere Erkenntnisse über die endogene Induktion von AMP, insbesondere RNase 7, in Keratinozyten durch verschiedene Zytokine zu sammeln. Dafür wurden humane Keratinozyten aus infantilen Vorhäuten entsprechend aufgearbeitet (s. 2.2) und im Folgenden mit IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimuliert.

Anschließend wurden das Ausmaß der Induktion der AMP mittels ELISA und „real-time“-RT-PCR analysiert. Die jeweilige Stimulationsdauer betrug ca. 16 h. Als Kontrolle dienten bei jedem Stimulationsversuch unstimulierte Keratinozyten, die ausschließlich mit Nährmedium (Epilife) versetzt wurden.

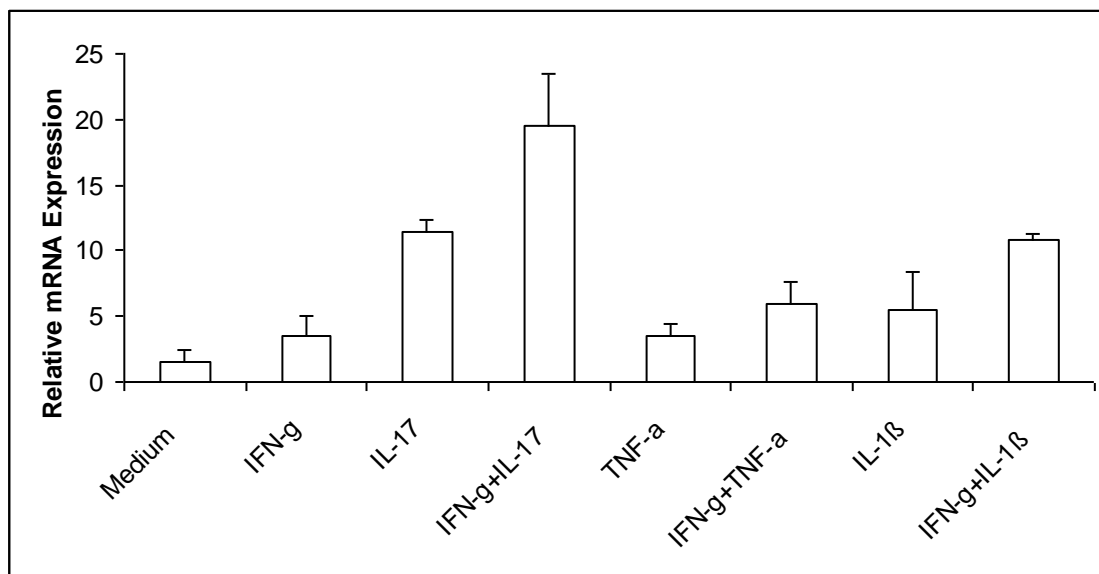
#### 3.1.1 Induktion von RNase 7 durch Zytokine



**Abb. 1: Sekretion von RNase 7 nach Stimulation mit Zytokinen.** Messung der Sekretion von RNase 7 mittels ELISA aus den Überständen der stimulierten Keratinozyten. Die Einzelkonzentration des Stimulus betrug jeweils 40 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 20 ng/ml. Die Stimulation erfolgte über 16 h. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet. Aus redaktionellen Gründen wurde in dieser und den nachfolgenden Abbildungen IFN- $\gamma$  mit IFN-g, TNF- $\alpha$  mit TNF-a und TGF- $\alpha$  mit TGF-a bezeichnet.

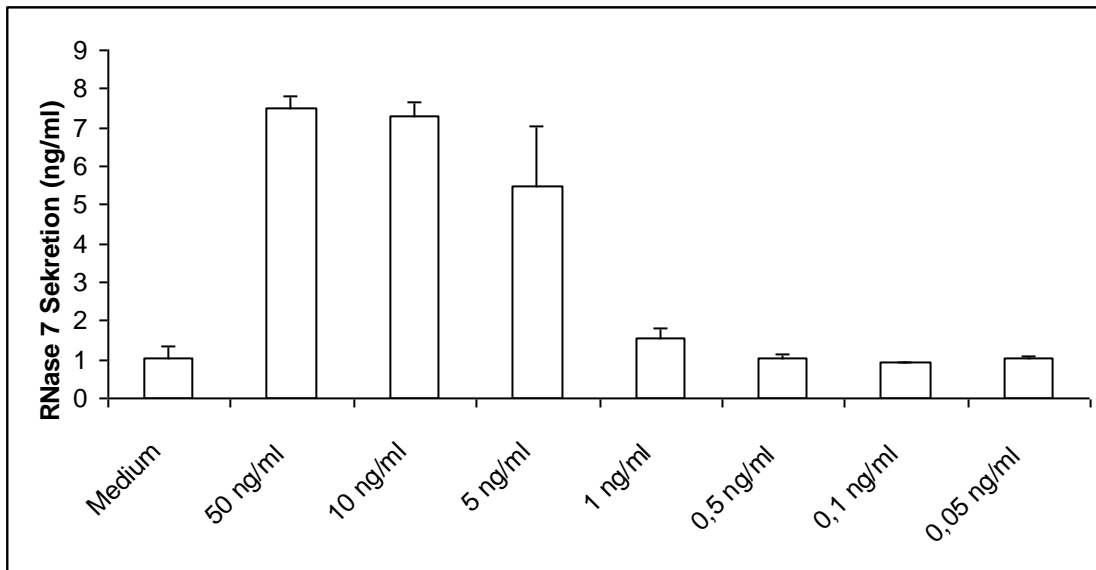
Während sich nach Inkubation der Keratinozyten mit IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  allein im ELISA nur wenig Stimulation darstellte, zeigte sich vor allem die

Kombination IFN- $\gamma$  plus IL-17 als äußerst potent bei der Induktion von RNase 7 (Abb. 1). Zur Darstellung auf Ebene der Genexpression wurde eine RNA Isolierung aus den Keratinozyten vorgenommen und eine RT-PCR durchgeführt (s. Abb. 2) Hier bestätigte sich die Aussage, dass insbesondere die Kombination von IFN- $\gamma$  mit IL-17 eine hohe Induktion von RNase 7 hervorruft. In diesem Fall betrug diese etwa das 20-fache im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Die Kombination von IFN- $\gamma$  mit IL-1 $\beta$ , bzw. TNF- $\alpha$  führte ebenfalls zu einer verstärkten Expression von RNase 7.



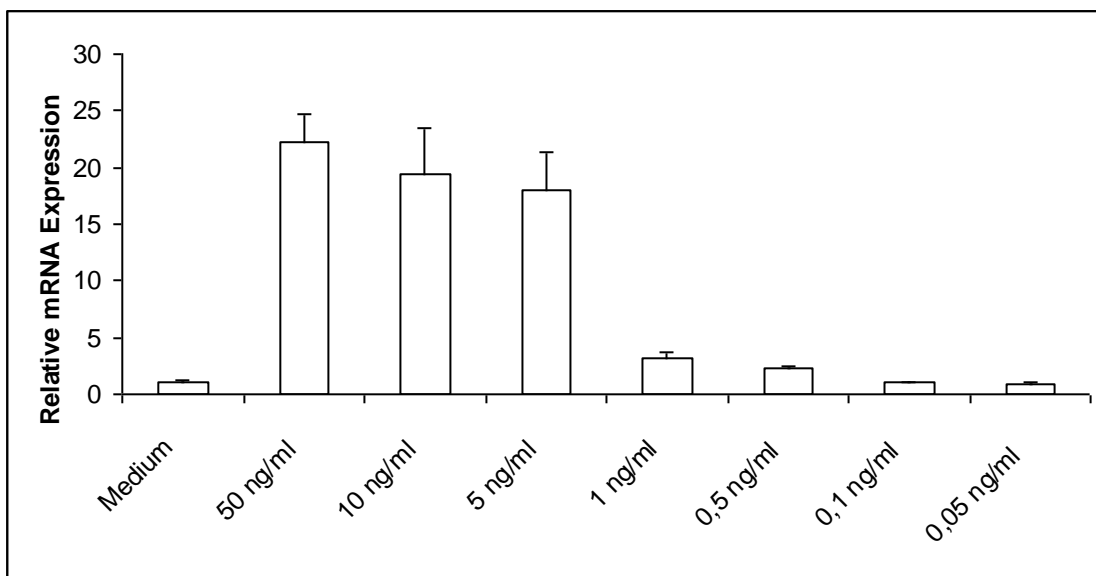
**Abb. 2: Relative mRNA-Expression von RNase 7 nach Stimulation mit Zytokinen.** Gezeigt wird die relative mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Die Einzelkonzentration des Stimulus betrug jeweils 50 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 25 ng/ml. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Um herauszufinden, bis zu welcher Konzentration die Kombination speziell der beiden Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17 eine signifikante Induktion hervorruft, wurden primäre Keratinozyten in absteigender Konzentration mit diesen beiden Substanzen stimuliert. Anschließend erfolgte ein ELISA (Abb. 3) sowie eine „real-time“ PCR (Abb. 4). Im ELISA ergab sich dabei eine 7 - 8-fach erhöhte Sekretion von RNase 7 im Vergleich zu den unstimulierten Keratinozyten bei einer Konzentration von je 50 ng/ml Substanz. Selbst bei einer Zytokin-Konzentration von 5 ng/ml zeigte sich noch eine etwa 5-fach höhere Sekretion im Vergleich zu den mit Medium versetzten Zellen.



**Abb. 3: Sekretion von RNase 7 nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  plus IL-17 in absteigender Konzentration.** Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli. Messung der Sekretion von RNase 7 mittels ELISA aus den Überständen der stimulierten Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 16 h. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Die Beobachtung, dass IFN- $\gamma$  in Kombination mit IL-17 noch bei einer Konzentration von 5 ng/ml eine signifikante Induktion von RNase 7 bewirkt, bestätigte sich in der durchgeführten „real-time“-PCR. Hier zeigte sich eine etwa 20-fache Erhöhung der mRNA-Expression in Relation zu den nur mit Medium versetzten humanen Keratinozyten (Abb. 4).

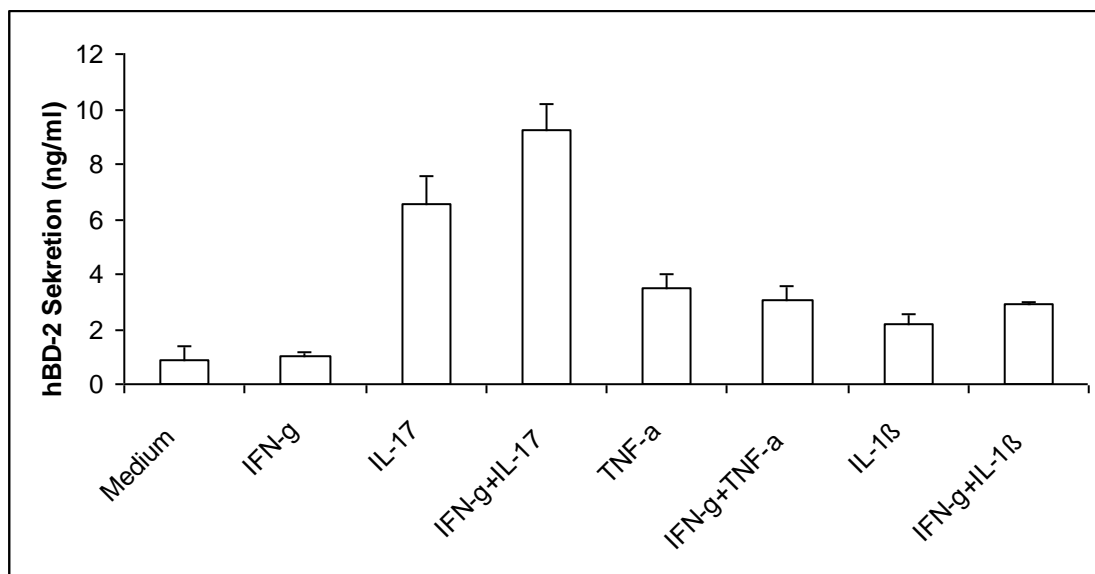


**Abb. 4: Relative mRNA-Expression von RNase 7 nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  plus IL-17 in absteigender Konzentration.** Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli. Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von RNase 7 im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

### 3.2 hBD-2

hBD-2 ist ein AMP, das von den meisten Epithelien des Menschen gebildet wird. Die Induktion durch Bakterien und einige Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist bekannt (Schröder und Harder 1999). Ziel dieser Arbeit war unter anderem, die Induzierbarkeit durch die besonders potent erscheinende Kombination IFN- $\gamma$  mit IL-17 zu untersuchen und darzustellen sowie die Kombination weiterer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mit IFN- $\gamma$  in Hinsicht auf Synergismus zu testen. Wiederum erfolgte die Stimulation humaner primärer Keratinozyten für ca. 16 h. Zur Messung der Induktion wurde ein ELISA, sowie nach RNA-Isolierung die „real-time“- RT-PCR durchgeführt.

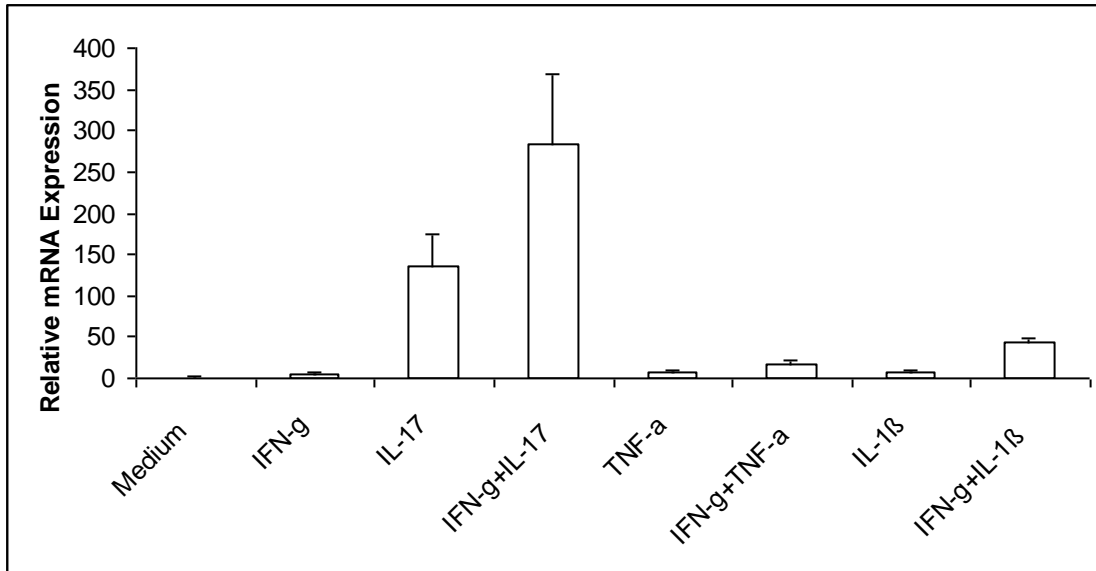
#### 3.2.1 Induktion von hBD-2 durch Zytokine



**Abb. 5: Sekretion von hBD-2 nach Stimulation mit Zytokinen.** Messung der Sekretion von hBD-2 mittels ELISA aus den Überständen der stimulierten humanen Keratinozyten. Die Einzelkonzentration des Stimulus betrug jeweils 50 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 25 ng/ml. Die Stimulation erfolgte über 16 h. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Im durchgeführten hBD-2-ELISA (Abb. 5) wurde deutlich, dass schon IL-17 allein ein potenter Induktor für hBD-2 ist (etwa 6-fach höhere Sekretion), die Kombination aus IFN- $\gamma$  mit IL-17 aber eine noch höhere Sekretion von hBD-2 aufwies (9-fach). IFN- $\gamma$  allein verursachte keine Induktion. Die Kombinationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mit IFN- $\gamma$

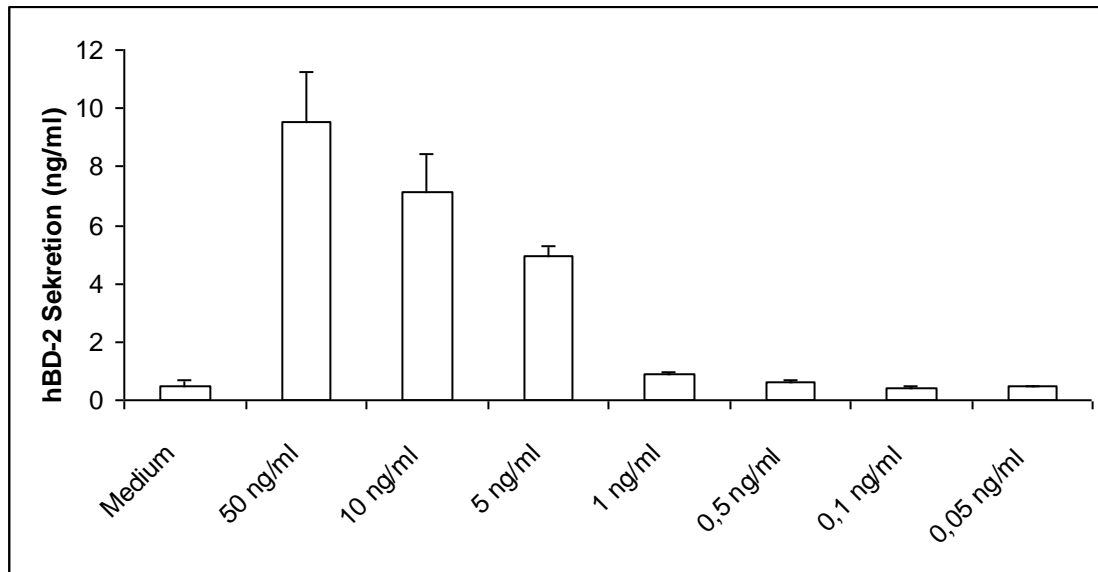
verursachten in diesem Fall keine höhere Sekretion als durch die jeweiligen Einzelsubstanzen. In der anschließend durchgeführten „real-time“-RT-PCR bestätigten sich diese Resultate (Abb. 6).



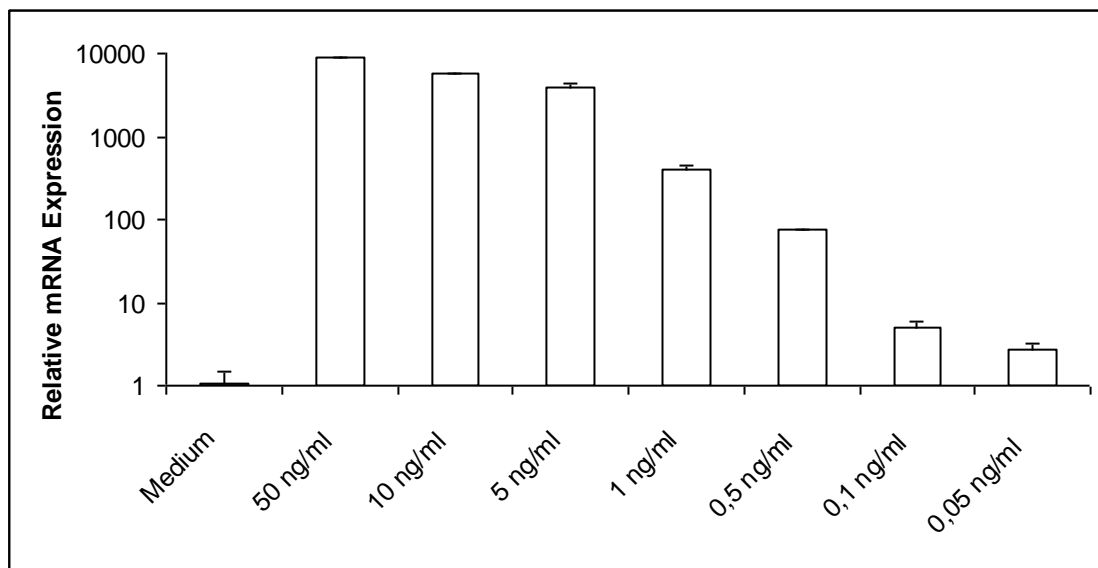
**Abb. 6: Relative mRNA-Expression von hBD-2 nach Stimulation mit Zytokinen.** Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von hBD-2 im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Die Einzelkonzentration des Stimulus betrug jeweils 50 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 25 ng/ml. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Die relative mRNA-Expression lag bei den mit IFN-γ plus IL-17 stimulierten Zellen um das 300-fache höher als bei den unstimulierten Keratinozyten. Auf Ebene der mRNA war ebenfalls ein Synergismus von IFN-γ mit IL-1β zu sehen (etwa 40-fache Expression).

Um weiterhin zu prüfen, bis zu welcher Konzentration die Kombination aus IFN-γ mit IL-17 hBD-2 induziert, wurde eine Konzentrationsreihe angefertigt und aus den Überständen der damit stimulierten Zellen ein hBD-2 ELISA angefertigt (Abb. 7). Hier wurde ersichtlich, dass selbst bei einer Zytokinkonzentration von je 1 ng/ml noch eine etwa doppelt so hohe Sekretion von hBD-2 besteht als bei den unstimulierten Keratinozyten. Bei der „real-time“-RT-PCR konnte dann eine 8000-fache Induktion der Genexpression im Vergleich mit den unstimulierten Keratinozyten bei einer Konzentration von 50 ng/ml pro Stimulussubstanz dargestellt werden (Abb. 8). Somit ergab sich eine deutlich höhere absolute Induktion als in dem in Abb. 6 dargestellten Versuch, was auf die Verwendung von Keratinozyten unterschiedlicher Spender zurückzuführen sein könnte. Selbst bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml lag noch eine 2,5-fach erhöhte relative mRNA-Expression vor (Abb. 8).



**Abb. 7: Sekretion von hBD-2 nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  plus IL-17 in absteigender Konzentration.** Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli. Messung der Sekretion von hBD-2 mittels ELISA aus den Überständen der stimulierten Keratinozyten. Die Stimulation erfolgte über 16 h. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

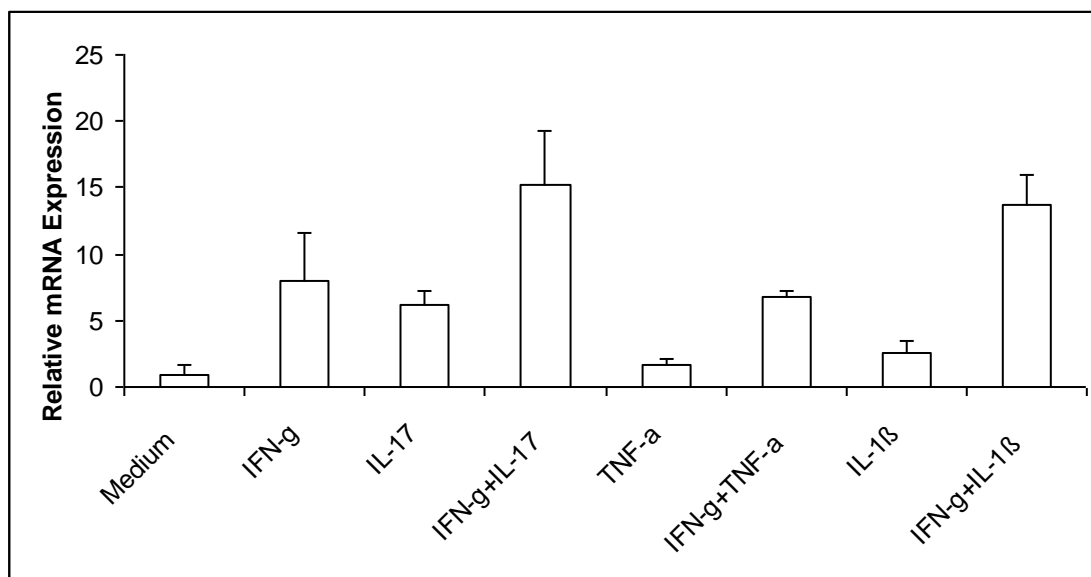


**Abb. 8: Relative mRNA-Expression von hBD-2 nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  plus IL-17 in absteigender Konzentration.** Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli. Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von hBD-2 im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

### 3.3 hBD-3

Über hBD-3 ist bekannt, dass es durch TNF- $\alpha$  und IL-1 in kultivierten Chondrozyten (Varoga et al. 2005) und durch Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* in humanen Keratinozyten induzierbar ist (Harder et al. 2001, Schneider et al. 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war es auch in diesem Fall, eine Induzierbarkeit durch verschiedene Zytokine allein und in Kombination mit IFN- $\gamma$  zu untersuchen. Dargestellt sind ausschließlich Ergebnisse aus durchgeführten „real-time“-PCR Untersuchungen, da zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente noch kein hBD-3-ELISA zur Verfügung stand. Die humanen Keratinozyten wurden aufgearbeitet und 16 h mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert (s. 2.2). Anschließend erfolgte die RNA Isolierung mit nachfolgender „real-time“- RT-PCR.

#### 3.3.1 Induktion von hBD-3 durch Zytokine

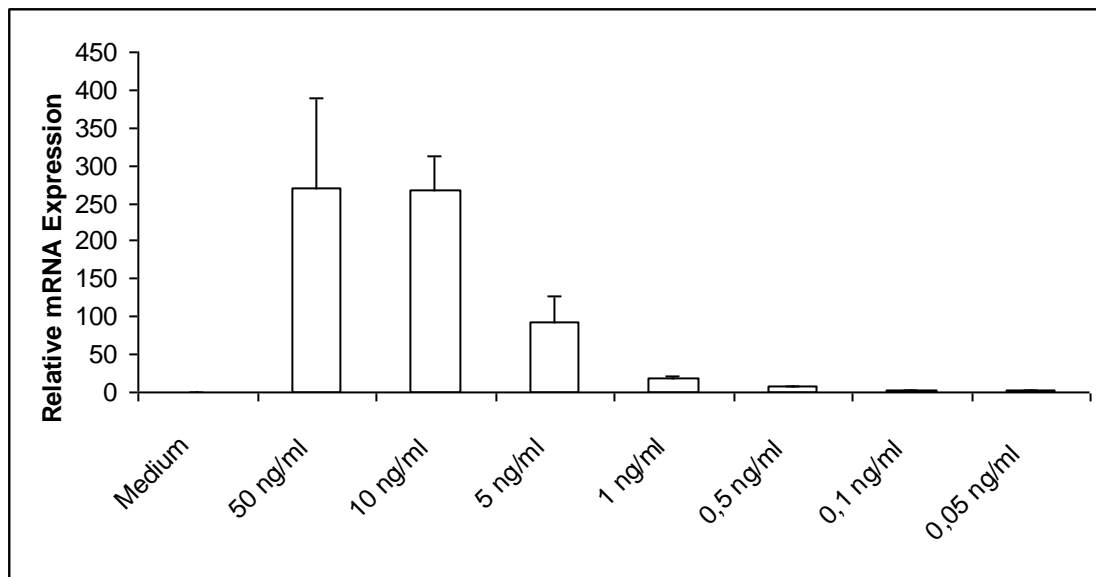


**Abb. 9: Relative mRNA-Expression von hBD-3 nach Stimulation mit Zytokinen.** Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von hBD-3 im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Die Einzelkonzentration des Stimulus betrug jeweils 50 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 25 ng/ml. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Aus Abb. 9 wird ersichtlich, dass die Induktion von hBD-3 durch IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) und IL-17 (50 ng/ml) allein in etwa gleich hoch war (7 - 8-fach im Vergleich zu nur mit Nährmedium stimulierten Zellen). Die Kombination dieser beiden Zytokine führte ebenso wie bei RNase 7 und hBD-2 zu einem verstärkenden Effekt, die relative



mRNA-Expression war im Vergleich zu den unstimulierten Keratinozyten 15-fach höher. Auch für IL-1 $\beta$  in Kombination mit IFN- $\gamma$  konnte ein verstärkender Effekt beobachtet werden, jedoch nicht für TNF- $\alpha$  in Kombination mit IFN- $\gamma$ . Um die Aktivität der Kombination von IFN- $\gamma$  und IL-17 detaillierter zu untersuchen, wurde wiederum eine Konzentrationsreihe erstellt, mit der humane Keratinozyten stimuliert wurden. Anschließend erfolgte eine „real-time“-RT-PCR (Abb.10).



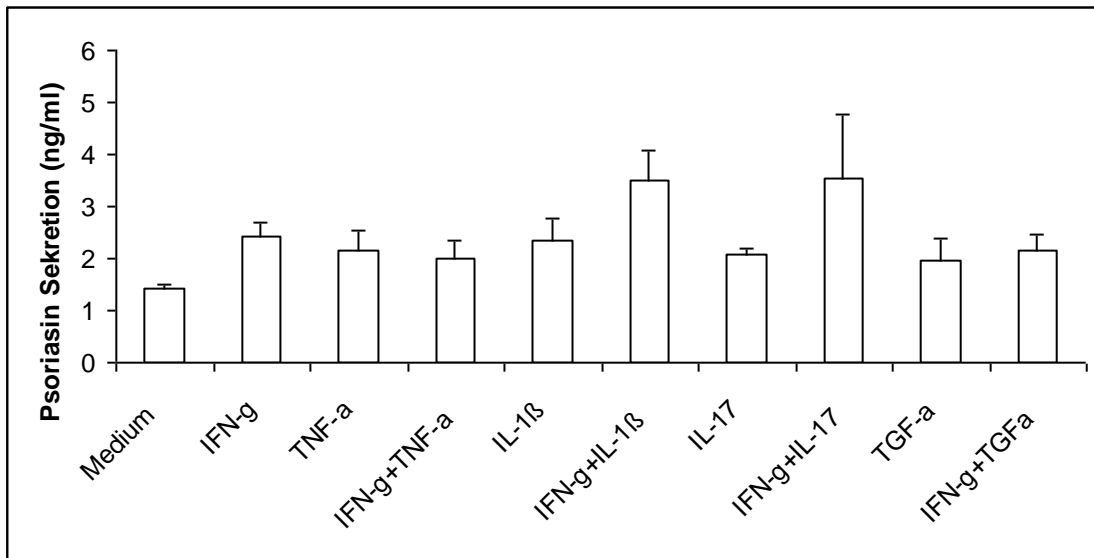
**Abb. 10: Relative mRNA-Expression von hBD-3 Stimulation durch IFN- $\gamma$  plus IL-17 in absteigender Konzentration. Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli.** Gezeigt wird die relative mRNA-Expression von hBD-3 im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

Bei einer Stimuluskonzentration von je 50 ng/ml und je 10 ng/ml war jeweils noch eine ca. 250-fach erhöhte relative mRNA-Expression messbar, selbst bei einer Stimuluskonzentration von nur noch 0,5 ng/ml war noch eine 6 - 7-fach erhöhte relative mRNA-Expression messbar, bei 0,1 ng/ml immerhin noch eine doppelt so hohe Expression im Vergleich zu den nur mit Nährmedium versetzten Zellen.

### 3.4 Psoriasis

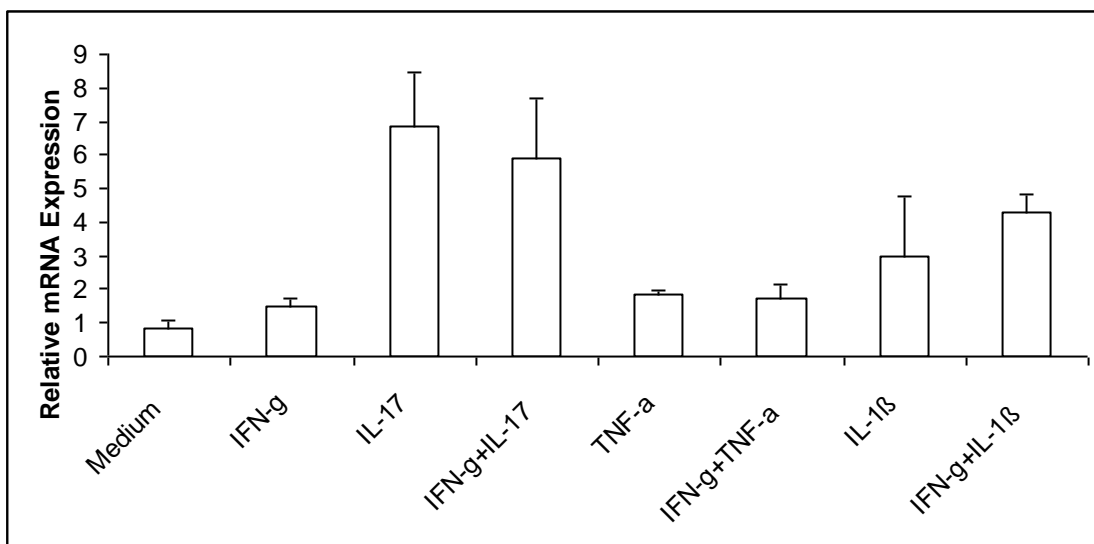
Die Induzierbarkeit von Psoriasis durch *E. coli* und einige proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und in geringerem Ausmaß auch TNF- $\alpha$  ist bekannt (Gläser et al. 2005). Auch für Psoriasis sollte daher in der vorliegenden Arbeit ein möglicher Synergismus von IFN- $\gamma$  mit verschiedenen Zytokinen untersucht werden.

### 3.4.1 Induktion von Psoriasin durch Zytokine



**Abb. 11: Sekretion von Psoriasin nach Stimulation mit Zytokinen.** Messung der Sekretion von Psoriasin mittels ELISA aus den Überständen der stimulierten Keratinozyten. Die Einzelkonzentration der Stimuli betrug jeweils 40 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 20 ng/ml. Die Stimulation erfolgte über 16 h. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

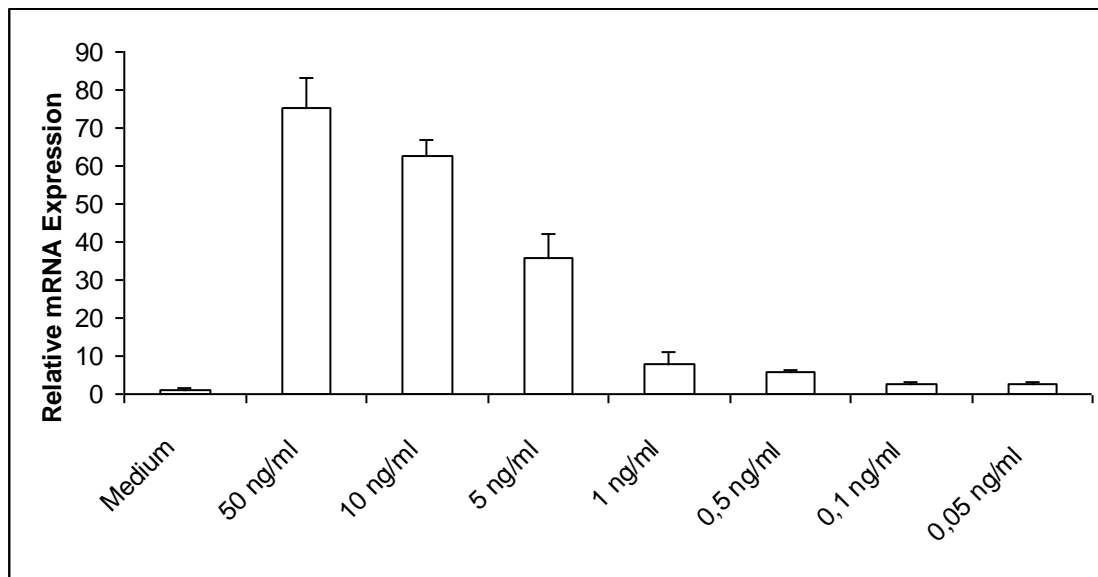
Im ELISA stellte sich eine relativ gering erhöhte Sekretion von Psoriasin im Vergleich zu den unstimulierten Zellen dar, ein leicht verstärkender Effekt war bei der Kombinationen IFN- $\gamma$  mit IL-17 und IFN- $\gamma$  mit IL-1 $\beta$  sichtbar (Abb.11).



**Abb. 12: Relative mRNA-Expression von Psoriasin nach Stimulation mit Zytokinen.** Gezeigt ist die relative mRNA-Expression von Psoriasin im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Die Einzelkonzentration der Stimuli betrug jeweils 50 ng/ml, bei Kombination der Stimuli je 25 ng/ml. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

In der anschließend durchgeführten „real-time“-PCR fand sich eine deutliche Induzierbarkeit der mRNA-Expression von Psoriasin durch IL-17 und die Kombinationen von IL-17 mit IFN- $\gamma$  bzw. mit IL-1 $\beta$ . Die Kombination von IFN- $\gamma$  mit IL-17 wies in diesem Fall keinen verstärkenden Effekt gegenüber IL-17 allein auf, allerdings ließ sich eine leicht verstärkende Wirkung von IFN- $\gamma$  in Kombination mit IL-1 $\beta$  erkennen (Abb. 12).

Auch hier wurde wieder eine Verdünnungsreihe mit der Kombination von IFN- $\gamma$  und IL-17 hinsichtlich Psoriasin-Induzierbarkeit durchgeführt (Abb. 13). Hier zeigte sich noch bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml eine ca. 5-fache Induktion. Im Vergleich zu Abb.12 zeigte sich hier eine höhere Induktion, dies könnte auf Spender und Zellphysiologische Unterschiede (Konfluenz, Differenzierungsgrad) zurückzuführen sein.



**Abb. 13: Relative mRNA-Expression von Psoriasin bei Stimulation durch IFN- $\gamma$  mit IL-17. Angegeben ist die jeweilige Einzelkonzentration der Stimuli.** Gezeigt ist die relative mRNA-Expression im Vergleich zu der mRNA-Expression der Glycerinaldehydphosphat-3-Dehydrogenase. Als Kontrolle wurde Nährmedium ohne Stimulussubstanz verwendet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Untersuchte AMP der Haut

Die menschliche Haut schützt unseren Körper vor zahlreichen potentiell schädlichen äußeren Einflüssen physikalischer, chemischer und mikrobiologischer Natur. An vielen Lokalisationen ist sie die erste Barriere für Mikroorganismen und toxische Substanzen. Zu diesem Zweck bestehen neben einem komplexen Immunsystem, das aus zellulärer und humoraler Abwehr besteht, auch physikalische (z. B. Abschilferung toter Zellen) und chemische Abwehrmechanismen wie die antimikrobiellen Proteine (AMP). AMP sind überwiegend kationische Peptide mit antimikrobieller Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze, sowie chemotaktischer Aktivität auf Effektorzellen des Immunsystems. Die Proteinsekretion bzw. Genexpression einiger AMP wie hBD-2, hBD-3, RNase 7 und Psoriasin kann durch verschiedene Stimuli wie Zytokine und Mikroorganismen hochreguliert werden (Kisich et al. 2001, Harder und Schröder 2002, Zhang et al. 2003, Harder et al. 2004, Gläser et al. 2005, Schröder und Harder 2006, Simanski et al. 2009).

HBD-2 war das erste AMP, das als induzierbar identifiziert wurde (Harder et al. 1997). Es wird in humanen Keratinozyten, respiratorischem Epithel und im Intestinaltrakt gebildet (Harder et al. 1997b, Harder et al. 2007). Seine antimikrobielle Aktivität ist vor allem gegen gramnegative Bakterien und Pilze gerichtet (Schröder und Harder 1999). Bekannt ist weiterhin, dass die Expression von hBD-2 durch IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-17 und Bakterien induzierbar ist (Krisanaprakornkit et al. 2000, Liu et al. 2002, Kao et al. 2004, Harder 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass vor allem die Kombination aus IFN- $\gamma$  und IL-17 als Stimulus besonders potent ist, um die Protein- und Genexpression von hBD-2 in humanen Keratinozyten hochzuregulieren. Besonders interessant ist in diesem Fall, dass beschrieben wurde, dass IFN- $\gamma$  als alleiniger Stimulus kein Induktor der Expression von hBD-2 ist (Kisich et al. 2001).

Ein weiteres AMP der Gruppe der humanen  $\beta$ -Defensine ist hBD-3. Es kommt in Keratinozyten, respiratorischem Epithel, Gingivaepithel, Trachea und Skelettmuskel vor und besitzt ein weites Wirkspektrum (Harder et al. 2001, Garcia et al. 2001, Sahly et al. 2003). Eine Besonderheit ist außerdem, dass das Wirkspektrum multiresistente Keime wie VRE und MRSA einschließt (Garcia et al. 2001, Harder et al. 2001).

Weiterhin wirkt hBD-3 inhibierend auf verschiedene Viren, zum Beispiel HSV (Hoover et al. 2003, Sahly et al. 2003, Hazrati et al. 2006) und HIV (Quinones-Mateu et al. 2003). Die Expression von hBD-3 kann durch Bakterien und IFN- $\gamma$  induziert werden (Harder et al. 2004, Menzies und Kenoyer 2006).

Psoriasin ist ein dominierendes AMP der menschlichen Haut und besonders wirksam gegen *E. coli*. Es kommt in Keratinozyten, Sebozyten, respiratorischem Epithel und dem Urogenitaltrakt vor (Gläser et al. 2005, Li et al. 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit der Kombination von IFN- $\gamma$  plus IL-17 führten zu keiner höheren Induktion von Psoriasin als eine alleinige Stimulation mit IL-17. Die Kombination aus IL-1 $\beta$  mit IFN- $\gamma$  zeigte dagegen einen verstärkenden Effekt.

Neben Psoriasin ist RNase 7 eines der wichtigsten konstitutiv exprimierten AMP der Haut (Harder und Schröder 2002, Köten et al. 2009). RNase 7 wird neben der Haut auch im respiratorischen Epithel und teilweise auch im Urogenitaltrakt exprimiert. Es besitzt ein weites antimikrobielles Spektrum gegen Bakterien und Pilze schon in nanomolekularer Konzentration (Harder und Schröder 2002). Induziert wird RNase 7 u. a. durch IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Schröder und Harder 2006).

## 4.2 Verwendete Zytokine

Die in dieser Arbeit verwendeten Stimulussubstanzen bestanden aus Entzündungsmediatoren, die zumeist aus T-Zellen bei einer Entzündungsreaktion ausgeschüttet werden.

IFN- $\gamma$  wird aus CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen freigesetzt und aktiviert Keratinozyten. Es stimuliert ebenfalls die Chemokinfreisetzung (z. B. IL-8) aus Mukosazellen (Andoh et al. 2001). IFN- $\gamma$  induziert außer den AMP auch multiple Proteine, die eine essenzielle Rolle bei der Antigenpräsentation spielen, aktiviert Makrophagen und induziert in Synergismus mit IL-17 endotheliale Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) (Albanesi et al. 1999, Williams 2003). Rezeptoren für IFN- $\gamma$  kommen in gesunder Haut in Keratinozyten und in allen epidermalen Schichten außer dem Stratum corneum vor (Scheynius 1992).

IL-17 wird ebenfalls aus T- Zellen (CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$ , CD45) freigesetzt, u. a. auch aus sog. TH17- Zellen (eine IL-17 und IL-22 produzierende T- Zelle) (Van Beelen et al. 2007, Guttman-Yassky et al. 2008). Ein Rezeptor für IL-17 (IL-17 RA) ist hingegen auf vielen verschiedenen Zelltypen wie Osteo- und Fibroblasten sowie

hämatopoetischen Zellen und auf humanen Keratinozyten zu finden (Albanesi et al. 1999, Andoh et al. 2001, Van Beelen et al. 2007). IL-17 induziert u. a. verschiedene Mediatoren, die mit Entzündungsreaktionen assoziiert sind wie z. B. IL-6, G-CSF, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie Chemokine und ICAM-1 (Andoh et al. 2001, Yu und Gaffen 2008). In Synergismus mit IFN- $\gamma$  erhöht IL-17 die mRNA-Expression sowie die Proteinsekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, IL-15 und die COX-2 Produktion. Weiterhin induziert IL-17 die Expression von  $\beta$ -Defensinen und Psoriasin sowie des antibakteriellen Proteins 24p3 (Teunissen et al. 1998, Ruddy et al. 2004, Shen et al. 2005, Yu und Gaffen 2008).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich auch ein synergistischer Effekt der Kombination von IFN- $\gamma$  mit IL-17 hinsichtlich der AMP-Produktion in Keratinozyten darstellen lässt.

IL-1 $\beta$  wird von Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen und dendritischen Zellen produziert und sezerniert. Über den NF- $\kappa$ B Signalweg ist es IL-1 $\beta$  möglich, Gene, die relevant für die Produktion und Sekretion von z. B. Cyclooxygenasen, Adhäsionsmolekülen und Chemokinen sind, zu aktivieren. IL-1 wird generell bei Zellverletzungen jeglicher Art freigesetzt und wirkt chemotaktisch auf T-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Adhäsionsmoleküle (Williams 2003).

TNF- $\alpha$  wird aus CD4+ und CD8+ T-Zellen und myeloiden Zellen freigesetzt. Es ist verantwortlich für vielfältige proinflammatorische Effekte wie Stimulation von Mukosazellen zur Chemokinsekretion oder Induktion der Apoptose (Andoh et al. 2001). Klinisch relevant ist unter anderem, dass Keratinozyten nach Stimulation mit UV-Licht beträchtliche Mengen TNF- $\alpha$  produzieren und dass Hautentzündungen bei Kontaktallergien ebenfalls mit einer hohen TNF- $\alpha$  Produktion einhergehen. Auch bei den Erkrankungen Psoriasis vulgaris und rheumatoider Arthritis spielt es eine zentrale Rolle, was man sich therapeutisch z. B. mit Infliximab, einem TNF- $\alpha$ -Antikörper, zunutze macht (Williams 2003). Bekannt ist außerdem, dass TNF- $\alpha$  sowohl die mRNA-Expression von RNase 7, als auch von hBD-2 in Keratinozyten induziert (Schröder und Harder 1999, Schröder und Harder 2006). In dieser Arbeit konnte zusätzlich eine Induktion von Psoriasin gezeigt werden (Abb.11 und 12).

Die letzte verwendete Stimulussubstanz war TGF- $\alpha$ . TGF- $\alpha$  ist Bestandteil der "Epidermal growth factor" (EGF)-Familie und bindet an den EGF-Rezeptor (EGFR). Die Mediatoren dieser Familie sind wichtige Regulatoren bei Zellproliferation und

Zellmotilität sowie bei der Aktivierung proinflammatorischer Prozesse. Die Vermittlung dieser Prozesse folgt dem EGFR-Signaltransduktionsweg, der einen großen Einfluss auf die Entzündungsreaktionen der Haut besitzt, indem er Abwehrmechanismen fördert und gleichzeitig einer Überaktivierung von proinflammatorischen Reaktionen aus Keratinozyten entgegenzuwirken versucht (Harvey et al. 1991, Pastore et al. 2008). Ebenfalls über den EGFR-Signaltransduktionsweg induziert TGF- $\alpha$  die Expression von hBD-3 in humanen Keratinozyten (Sörensen et al. 2003, 2005).

Die verwendeten Stimulussubstanzen in dieser Arbeit sind also als repräsentative Entzündungsmediatoren - auch in Bezug auf immunomodulatorische Vorgänge in der Haut - anzusehen, die *in vivo* wichtige Funktionen im menschlichen Immunsystem besitzen.

#### 4.3 Signalvermittlung über Transkriptionsfaktoren

Die Verknüpfung zwischen Stimulussubstanzen und AMP lässt sich unter anderem über bestimmte Transkriptionsfaktoren bilden: Sowohl für IL-17, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist bekannt, dass sie den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren (Williams 2003, Kao et al. 2004, Royuela et al. 2008). NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der insbesondere bei entzündlichen Reaktionen eine elementare Rolle spielt und in fast allen Geweben vorkommt. So können zum Beispiel TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  über diesen Signalweg dafür sorgen, dass COX-2 vermehrt transkribiert wird und so zu einer verstärkten Bildung von Prostaglandin E2 führt (Yu und Gaffen 2008). Prostaglandin E2 ist einer der Hauptauslöser von Fieber und erhöht u. a. die Gefäßpermeabilität (Simmons et al. 2004). Durch ähnliche Mechanismen führt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auch zu einer vermehrten Synthese von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren Zytokinen. Auch die AMP Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3 besitzen in ihrer Promotorregion eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der an ihrer Induktion beteiligt ist (Wehkamp et al. 2006, Simanski et al. 2010). Bei hBD-2 ist zum Beispiel NF- $\kappa$ B (und der Transkriptionsfaktor AP-1) verantwortlich für die Induktion durch Bakterien, sowie durch IL-1 $\beta$  und IL-17 (McDermott et al. 2003, Kao et al. 2004, Wehkamp et al. 2004, Wehkamp et al. 2006).

IFN- $\gamma$  hingegen ist ein potenter Aktivator des Transkriptionsfaktors STAT1 (Takahashi et al. 1999) und STAT3 (Federici et al. 2002). Diese beiden

Transkriptionsfaktoren sind zum Beispiel an der Induktion von hBD-2 und hBD-3 durch Histamin beteiligt (Ishikawa et al. 2009, Kanda und Watanabe 2008). Die Promoterregion aller in dieser Arbeit untersuchten AMP besitzen potentielle Bindungsstellen für STAT1. Somit könnte man vermuten, dass STAT1 und NF-κB in die AMP-Induktion nach Stimulierung mit der Kombination aus IFN-γ und IL-17 involviert sind. Weiterführende, noch unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe außerhalb dieser Arbeit konnten dies mittels RNA-Interferenz bestätigen (Simanski et al. 2010). Allerdings führte die Kombination von IFN-γ und IL-17 zu keiner synergistischen Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren, weder von NF-κB noch von STAT-1 (Simanski et al. 2010). Eine Erklärung wäre, dass eine parallele Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB durch IL-17 und STAT1 durch IFN-γ zu einer erhöhten Expression von AMP führt, möglicherweise durch direkte Wechselwirkungen von NF-κB mit STAT1 (Ganster et al. 2005, Kimura 2009). Vor allem in Hinblick auf zukünftige neue mögliche Therapieansätze ist eine weitere Erforschung der Signalwege und Transkriptionsfaktoren, die in die Induktion von AMP involviert sind, unerlässlich. Dies könnte zur Entwicklung von neuen Strategien führen, die die gezielte Aktivierung der AMP- Expression zum Ziel haben.

#### 4.4 Klinischer Bezug

Ein wichtiger klinischer Bezug zwischen Zytokinen und AMP und die Bedeutung eines gestörten Zusammenspiels lässt sich am Beispiel der Psoriasis vulgaris und der atopischen Dermatitis herstellen. Beides sind häufige, entzündliche Hauterkrankungen mit unterschiedlichen Entstehungsursachen- und Mechanismen. Die atopische Dermatitis geht häufig mit rezidivierenden und verkomplizierenden Hautinfektionen durch Bakterien, Pilze und Viren einher, während bei der Psoriasis vulgaris eine Infektion der Läsionsstellen selten ist. Dabei ist beiden Erkrankungen gemein, dass sie mit einer defekten Hautbarriere vergesellschaftet sind. Eine besondere Rolle wird bei den Infektionen der Läsionsstellen bei atopischer Dermatitis *S. aureus*, einem Keim, der häufig auch Ursache nosokomialer Infektionen ist, zugeschrieben. Er führt bei 30 % der Patienten bei atopischer Dermatitis zu infizierten Läsionen, bei bis zu 90 % lässt sich eine Besiedelung der Läsionen nachweisen. Läsionen der Patienten mit Psoriasis vulgaris hingegen sind deutlich seltener mit *S.aureus* besiedelt und infiziert. Patienten mit Psoriasis vulgaris leiden



auch seltener unter anderen Hauterkrankungen wie atopischer Dermatitis, Urtikaria oder Kontaktallergien (Christophers und Henseler 1987, Henseler und Christophers 1995).

Die induzierbaren  $\beta$ -Defensine werden in gesunder Haut in der Regel nur in geringen Mengen produziert. Bei einer Verletzung oder Infektion akkumulieren sie jedoch in der Regel und ihre Protein- und Genexpression kann durch Entzündungsmediatoren wie Interferone und Interleukine induziert werden. Es wäre also anzunehmen, dass auch bei der Psoriasis vulgaris und der atopischen Dermatitis sowohl die Mediatoren als auch die AMP aufgrund der entzündlichen Genese in erhöhten Konzentrationen vorzufinden sind. Tatsächlich wurde festgestellt, dass in psoriatischen Läsionen eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von z. B. hBD-2 (Ong et al. 2002), hBD-3 (Nomura et al. 2003) und RNase 7 besteht. Viele AMP lassen sich in hohen Mengen aus Psoriasissschuppen isolieren (Harder und Schröder 2005b). Vergleicht man hingegen die Läsion bei atopischer Dermatitis mit der Psoriasisläsion, findet man dort eine geringere Konzentration von AMP (z. B. von hBD-2 und hBD-3) (Gläser et al. 2009). Man hat sowohl für hBD-2, hBD-3 und RNase 7 jeweils verminderte Gen- und Proteinexpression in Keratinozyten aus atopischen Läsionen nachweisen können. Da hBD-3 und RNase 7 beide stark bakterizid auf *S. aureus* wirken (Harder et al. 2001, Dissertation B. Rudolph, CAU Kiel 2005), kam man zu der Annahme, dass z. B. die niedrigere hBD-3- Konzentration für die häufigen Infektionen von atopischen Läsionen mit *S.aureus* verantwortlich sein könnte (Nomura et al. 2003, Ong et al. 2002), oder allgemeiner, dass eine Defizienz von AMP zu einer erhöhten Anfälligkeit für Hautinfektionen führen kann. Als Ursache für die verringerte AMP-Induktion bei der atopischen Dermatitis kann zum einen eine Überexpression von inhibierenden Substanzen oder ein Mangel an induzierenden Substanzen angenommen werden. Nomura et al. und Ong et al. beschrieben, dass ein verändertes Zytokin-Milieu bei atopischer Dermatitis die Induktion der sog. „Innate immunity response genes“ verhindert; verursacht durch eine verminderte Konzentration von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , die beide, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, für die Induktion von AMP eine wichtige Rolle spielen. Bei mit IFN- $\gamma$  bzw. TNF- $\alpha$  stimulierten, aus gesunder Haut und aus atopischen Läsionen isolierten Keratinozyten, lässt sich nach Zugabe von IL-4 und IL-13 die  $\beta$ -Defensin- Produktion supprimieren. IL-4 und IL-13 sind sog. TH2-Zytokine, für die eine Überexpression bei

atopischer Dermatitis und generell eine Supprimierung der Expression von AMP bekannt ist (Hamid et al. 1994, Ong et al. 2002, Nomura et al. 2003).

Neuere Studien haben interessanterweise ergeben, dass für Psoriasin hingegen in atopischen Läsionen eine sehr hohe Expression und Sekretion stattfindet. Dies könnte erklären, weshalb im Gegensatz zu infizierten Läsionen mit *S. aureus* Infektionen mit *E. coli* nicht typisch sind (Gläser et al. 2009). Es wäre also auch hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Nutzen von AMP wichtig herauszufinden, ob für verschiedene Erkrankungen verschiedene „AMP-Profile“ bestehen und was die jeweilige Ursache für die veränderte Expression oder Sekretion der AMP bei den betreffenden Erkrankungen ist.

Sowohl für IL-17 als auch für IFN- $\gamma$ , welche in dieser Arbeit als besonders potente synergistisch wirkende Induktoren für die  $\beta$ -Defensine identifiziert wurden, ist bekannt, dass sie bei atopischer Dermatitis in deutlich niedrigeren Konzentrationen in der Haut vorhanden sind als bei der Psoriasis vulgaris (Teunissen et al. 1998, Guttman-Yassky et al. 2008, Kryczek et al. 2008). Somit könnten die niedrigeren Konzentrationen dieser potenten AMP-Induktoren ein zusätzlicher Grund dafür sein, warum bei der atopischen Dermatitis AMP weniger stark induziert sind. IL-17 ist durch Mechanismen wie z. B. Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ebenfalls an der Bekämpfung bakterieller Infektionen beteiligt (van Beelen et al. 2007).

Die typische epidermale Hyperplasie bei Psoriasis wird u. a. durch Leukozyten-abgeleitete Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  verursacht, welche beide potente Induktoren des EGFR-Signalweges sind, dessen Hauptfunktion wiederum der Regulation der Zellproliferation zugeschrieben wird (s. o.). Diese beiden Zytokine induzieren außerdem die Expression weiterer Entzündungsmediatoren wie Chemokine und Adhäsionsmoleküle, darunter auch IL-8, welches ebenfalls epitheliale und endotheliale Zellproliferation verursacht und an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beteiligt ist. Die IL-8 Genexpression wird zusätzlich über EGFR- Liganden wie TGF- $\alpha$  induziert, die bei psoriatischen Läsionen in erhöhten Konzentrationen zu finden sind (Pastore et al. 2008).

Zusätzlich kann TGF- $\alpha$  die Expression von TLR induzieren (TLR 5 und 9) (Miller et al. 2005). TLR werden u. a. von Keratinozyten exprimiert und führen zu einer erhöhten Expression von Genen, die für AMP codieren. Durch die Induktion von TLR durch TGF- $\alpha$  kann ebenfalls eine Hochregulation der IL-8- Sekretion sowie der hBD-2- und hBD-3- Ausschüttung (Pastore et al. 2008) erfolgen und dadurch antimikrobielle

Aktivität entfaltet werden. Die Ansicht, dass AMP außerdem noch selbst die Migration und Proliferation von Keratinozyten über den EGFR-Signalweg stimulieren, wurde auch durch Untersuchungen von Niyonsaba unterstützt (Niyonsaba et al. 2007), woraus man schließen könnte, dass die erhöhte AMP Konzentration nicht nur für die niedrige Infektionsanfälligkeit von Psoriasisläsionen verantwortlich ist, sondern auch für die Hyperproliferation der Keratinozyten.

Betrachtet man also abschließend, was für starke Induktoren Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-17 für die  $\beta$ -Defensine hBD-2 und -3 sind, kann man annehmen, dass eine resultierende verminderte Konzentration der  $\beta$ -Defensine und anderer AMP die Infektionsanfälligkeit des Epithels erhöht.

Hollox et al. haben gezeigt, dass erhöhte genomische Kopienzahlen von  $\beta$ -Defensinen mit einem erhöhten Risiko an Psoriasis vulgaris zu erkranken assoziiert sind (Hollox et al. 2008). Es ist also auch vorstellbar, dass ein Überschuss an AMP bzw. deren endogenen Stimulanzen (z. B. Zytokine) zu überschießenden Entzündungsreaktionen inklusive Einwanderung von Effektorzellen führen kann. So besitzen hBD-2 und -3 über den CCR6-Rezeptor chemotaktische Aktivität für T-Helferzellen und dendritische Zellen (Yang et al. 1999, Wu et al. 2003). Auf diese Weise können Effektorzellen zum Infektionsort gelockt werden und hBD-2 und hBD-3 fungieren auf diese Weise als Bindeglied zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem. Somit könnte man vermuten, dass die erhöhte Konzentration an AMP-induzierenden Zytokinen über synergistische Wirkungen das Auftreten der Psoriasis vulgaris begünstigen, indem AMP induziert werden, die durch ihre chemotaktische Aktivität entzündliche Prozesse fördern.

Daher wäre es interessant, sich in der Zukunft nicht nur mit den Induktoren, sondern auch mit den Inhibitoren der AMP zu beschäftigen. Zum Beispiel lässt sich die Induktion von hBD-2, hBD-3 und RNase 7 durch all-trans Retinsäure hemmen (Harder et al. 2004). Außerdem muss berücksichtigt werden, dass AMP nicht nur in humanen Keratinozyten, sondern auch in vielen anderen Geweben und Organen (z. B. in respiratorischen Epithelien und im Darm) gebildet werden. Es ist also auch gut möglich, dass sie dort durch Überexpression oder Mangel für eine Vielzahl von Erkrankungen mitverantwortlich sind oder zumindest eine bedeutende Rolle spielen.

## 4.5 Ausblick

Ein Ziel der Erforschung der AMP ist neben dem Verständnis von kutanen Abwehrmechanismen auch der mögliche therapeutische Einsatz. Denkbar wäre eine systemische Gabe oder eine lokale Applikation der AMP selbst auf den gewünschten Wirkort. Ein anderer Ansatz wäre eine indirekte Induktion der Expression: Bakterien oder Viren, für die eine entsprechende Induktion von AMP bekannt ist, könnten zum Beispiel in nicht-pathogener Form appliziert werden. Des Weiteren käme auch ein pharmakologischer Eingriff in die entsprechenden Signalkaskaden in Frage. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass bisher längst nicht alle Signalwege ausreichend untersucht sind. Dies ist aber für neue Therapieansätze unabdingbar, um genaue Wirkweisen und das Zusammenspiel zwischen Induktoren und Effektoren zu verstehen und mögliche Strategien zum Eingreifen in diese Strukturen zu entwickeln. Ebenfalls wäre es vorstellbar, körpereigene Botenstoffe wie die Interleukine, lokal oder systemisch einzusetzen. Allerdings müssen hier potentielle unerwünschte Effekte ausgeschlossen werden, da körpereigene Mediatoren oftmals diverse Funktionen im Körper ausüben können. Gerade die Applikation proinflammatorischer Zytokine könnte leicht überschießende oder unerwünschte Entzündungsreaktionen (z. B. durch Chemotaxis) forcieren. Deshalb ist es von Interesse, Substanzen zu finden, die selektiv die Expression von AMP induzieren, ohne dabei Entzündungskaskaden (z. B. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B) zu initiieren. Dabei müssten aber auch die immunomodulatorischen Eigenschaften vieler AMP, wie z. B. die chemotaktische Aktivität, berücksichtigt werden, um nicht durch eine zu starke Induktion von AMP potentiell unerwünschte Nebenwirkungen zu erhalten. Weiterhin sollte das Ziel bei Erforschung der AMP sein, Dysregulationen in ihrer Wirkweise, ihrem Zusammenspiel und ihrer Expression einschließlich der beteiligten Signaltransduktionswege aufzudecken und zu verstehen, wie diese zur Entstehung oder Verschlimmerung von Erkrankungen beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Die Haut ist die erste Grenzfläche von Lebewesen zu ihrer Umwelt. Sie ist permanent äußeren Einflüssen wie Mikroorganismen, verschiedenen Umgebungsmilieus und anderen potenziell gefährlichen Wirkstoffen ausgesetzt. Sie hat verschiedene Eigenschaften und Strategien entwickelt, um diesen effektiv zu begegnen und sich vor Schäden zu schützen. Dazu gehören neben mechanischen und physikalischen Mechanismen auch die so genannten antimikrobiellen Proteine (AMP), die offensichtlich eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren besitzen.

AMP werden u. a. in Keratinozyten exprimiert, weshalb in der vorliegenden Arbeit zu ihrer qualitativen und quantitativen Bestimmung humane Keratinozyten aus menschlichen Vorhäuten verwendet wurden.

Einige AMP, wie die antimikrobielle Ribonuklease RNase 7 oder Psoriasin (ein AMP mit starker bakterizider Wirksamkeit gegen *E. coli*) werden konstitutiv hoch exprimiert, während andere AMP wie die potenten AMP humanes Beta-Defensin-2 und -3 (hBD-2 und hBD-3) in unstimulierten Keratinozyten vergleichsweise gering exprimiert werden. Erste Arbeiten haben gezeigt, dass die Expression jedes dieser vier AMP in Keratinozyten durch Stimulation mit Mikroorganismen und Zytokinen induziert werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die Induzierbarkeit der oben aufgeführten AMP durch Zytokine und Wachstumsfaktoren in humanen Keratinozyten detailliert zu analysieren. Insbesondere sollte untersucht werden, welche synergistischen Effekte bei Kombination von IFN- $\gamma$  mit anderen Zytokinen bestehen. Dazu wurden die humanen Keratinozyten entsprechend mit verschiedenen Zytokinkombinationen stimuliert. Das Ausmaß der Proteinsekretion der jeweiligen AMP nach Stimulation wurde aus den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Anschließend erfolgte die Analyse der Induktion der mRNA-Expression mittels „Real-time“-PCR.

Es zeigte sich, dass insbesondere die Kombination von IFN- $\gamma$  mit IL-17 besonders potent ist, um die Protein- und Genexpression der AMP RNase 7, hBD-2 und hBD-3 synergistisch in Keratinozyten zu induzieren. Daraufhin wurden bei der Stimulation mit IFN- $\gamma$  plus IL-17 Verdünnungsreihen angefertigt, um zu verfolgen bis in welchen Stimuluskonzentrationsbereich eine Induktion der AMP vorhanden ist. Eine deutliche Induktion ließ sich dann bis in einen Bereich von wenigen ng/ml nachweisen. Vor

allem für hBD-2 und hBD-3 besteht eine extrem hohe Induktionsfähigkeit der mRNA-Expression durch die Kombination von IL-17 mit IFN- $\gamma$  (bei hBD-2 bis 8000-fach erhöhte Induktion bei je 50 ng/ml IL-17 plus IFN- $\gamma$ , um 400-fach erhöhte Induktion bei einer Konzentration von je 1 ng/ml). Interessanterweise ließ sich für Psoriasin kein synergistischer Effekt durch die o. g. Zytokinkombination nachweisen - die Induktion war etwa ebenso hoch wie durch IL-17 allein. Die Kombination IFN- $\gamma$  mit IL-1 $\beta$  zeigte sich hier als einzig potente Kombination. Auch bei hBD-2 und hBD-3 ließ sich ein synergistischer Effekt durch diese Kombination darstellen, allerdings nicht so ausgeprägt wie durch die Kombination aus IFN- $\gamma$  mit IL-17.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Kombination von Zytokinen, insbesondere von IFN- $\gamma$  mit IL-17, als äußerst potenter Induktor der AMP Expression von RNase-7, hBD-2 und hBD-3 in humanen Keratinozyten identifiziert werden.

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMP	Antimikrobielles Protein
AP-1	„activator protein- 1“ = Eigenname eines Transkriptionsfaktors
aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C. albicans	<i>Candida albicans</i>
C	Celsius
cDNA	„mRNA complementary DNA“ = komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
DMEM	„Dulbeccos modified Eagle´s medium“
DNA	„desoxyribonucleotid acid“ = Desoxyribonuklein- säure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
et.al	et alii = und andere
FCS	„fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSP	Genspezifischer Primer
h	Stunde
hBD	humanes Beta-Defensin

---

HCL	Salzsäure
HD	Humanes Defensin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
kDa	Kilo-Dalton
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 (= CD 54)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilo Basenpaare
M	Molar (mol/l)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NF-κB	„Nuclear Factor κB“ =Eigenname eines Transkriptionsfaktors
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“=Polymerase-Ketten- reaktion
RNA	„Ribonucleic acid“= Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.	siehe
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
STAT	„signal transducers and activators of transcription“ = Transkriptionsfaktoren-Familie
Std.	Standard
Tab.	Tabelle



TGF	„transforming growth factor“
TLR	„Toll-like“-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (= CD 106)
VRE	Vancomycin-resistente <i>Escherichia coli</i>

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

---

## Literaturverzeichnis

Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G (1999): IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . J Immunol, 162: 494-502

Andoh A, Takaya H, Makino J, Sato H, Bamba S, Araki Y, Hata K, Shimada M, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T (2001): Cooperation of interleukin-17 and interferon- $\gamma$  on chemokine secretion in human fetal intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol, 125: 56-63

Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM (1998): Human  $\beta$ -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. J Clin Invest, 102: 874-880

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG (1995): hBD-1: a novel  $\beta$ -defensin from human plasma. FEBS Lett, 368: 331-335

Boman HG (2003): Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Intern Med, 254: 197-215

Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL (2005): Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. J Invest Dermatol, 125: 9-13.

Bullard RS, Gibson W, Bose S, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, Hazen-Martin DJ et al. (2008): functional analysis of the host defense peptide human beta defensin-1: New insight into its potential role in cancer. Mol Immunol, 45: 839-848

Christophers E und Henseler T (1987): Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. Arch Dermatol Res, 279 (Suppl.): S.48

Chung WO und Dale BE (2004): Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. Infect Immun, 72; 1: 352-358

Cunliffe RN (2003):  $\alpha$ -Defensins in the gastrointestinal tract. *Mol Immunol*, 40: 463-467

Eckert RL und Lee KC (2006): S100A7 (Psoriasin): a story of mice and men. *J Invest Dermatol*, 126: 1442-1444

Elias PM, Feingold KR, Fluhr W (2003): Skin as an organ of protection. *In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen AZ, Freedberg IM, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (Hrsg.). Dermatology in General Medicine*, 6<sup>th</sup> Edition 2003, Mc Graw Hill, New York

Elias PM (2007): The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*, 29; 1: 3-14

Federici M, Giustizieri ML, Scarponi C, Girolomoni G, Albanesi C (2002): Impaired IFN-gamma dependent inflammatory responses in human keratinocytes overexpression the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol*, 169: 434-442

Fischer E (1959): Effect of perspiration and pH on the growth of skin-pathogenic fungi. *Dermatologica*, 118: 197-202

Ganster RW, Guo Z, Shao L, Geller DA (2005): Differential effects of TNF-alpha and IFN-gamma on gene transcription mediated by NF-kappaB-Stat1 interactions. *J Interferon Cytokine Res*, 11: 707-719

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. (1985): Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, 76: 1427-1435

Ganz T (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3: 710-720

Garcia JR, Jaumann F, Schulz S, Krause A, Rodriguez-Jeminez J, Forssmann U, Adermann K et al. (2001): Identification of a novel, multifunctional defensin (human  $\beta$ -defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interactivity with plasma

membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, 306: 257-264

Gläser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat Immunol*, 6: 57-64.

Gläser R, Meyer-Hoffert U, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Kobliakova J, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T (2009): The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 129: 641-649

Guttmann-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Zaba LC, Cardinale I, Nogales KE, Khatcherian A et al. (2008): Low expression of the IL-23/Th 17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol*, 181: 7420-7427

Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY (1994): Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 94: 870-876

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (1997): A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387;6636 :861

Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schröder JM (1997b): Mapping of the gene encoding human  $\beta$ -defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 46: 472-475

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001): Isolation and characterization of human  $\beta$ -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276; 8: 5707-5713

Harder J und Schröder JM (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277: 46779-46784

- Harder J, Meyer-Hoffert U, Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM (2004): Differential gene induction of human  $\beta$ -defensins (hBD-1, -2, -3, and -4) in keratinocytes is inhibited by retinoic acid. *J Invest Dermatol*, 123: 522-529
- Harder und Schröder JM (2005): Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy*, 86: 22-41
- Harder J und Schröder JM (2005b): Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol*, 77: 476-486
- Harder J, Gläser R, Schröder JM (2007): Human antimicrobial proteins-effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res*, 13; 6: 317-338
- Harvey TS, Wilkinson AJ, Tappin MJ, Cooke RM, Campbel ID (1991): The solution structure of human transforming growth factor  $\alpha$ . *Eur J Biochem*, 198: 555-562
- Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC (2006): Human  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol*, 177: 8658-8666
- Henseler T und Christophers E (1995): Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, 32: 982-6
- Hetru C, Troxler L, Hoffmann JA (2003): *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Diseases*, 187;Suppl.2: 327-334
- Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PLJM, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PCM et al. (2008): Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet*, 40; 1: 23-5
- Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubkowski J (2003): Antimicrobial characterization of human beta-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 74; 9: 2804-2809

Ishikawa T, Kanda N, Hau CS, Watanabe S (2009): Histamine induces human beta-defensin-3 production in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 56; 2: 121-127

Kanda N und Watanabe S (2008): Leptin enhances human  $\beta$ -defensin-2 production in human keratinocytes. *Endocrinology*, 149: 5189-5198

Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R (2004): IL-17 markedly up-regulates  $\beta$ -defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Immunol*, 173: 3482-3491

Kim J und Modlin RL (2003): Innate immunity and the skin. *In*: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen AZ, Freedberg IM, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (Hrsg.). *Dermatology in General Medicine*. 6<sup>th</sup> Edition 2003. Mc Graw Hill, New York

Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2009): Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med*, 206: 2027-2035

Kisich KO, Heifets L, Higgins M, Diamond G (2001): Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human  $\beta$ -defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 96; 4: 2692-2699

Köten B, Simanski M, Gläser R, Podschun R, Schröder JM, Harder J (2009): RNase 7 contributes to the cutaneous defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS One*, 4; 7: e6424

Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Weinberg A, Darveau RP, Bainbridge BW, Dale BA (2000): Inducible expression of human  $\beta$ -defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect Immun*, 68: 2907-2915

Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, Szeliga W, Wang Y, Liu Y, Welling TH, Elder JT, Zou W (2008): Induction of IL-17+ t-cell trafficking and development by IFN- $\gamma$ : mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol*, 181: 4733-4741

Li X, de Leeuw E, Lu W (2005): Total chemical synthesis of human psoriasin by native chemical ligation. *Biochemistry*, 44: 14685-14694

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006): Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by TH17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*, 203; 10: 2271-2279

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T (2002): Human  $\beta$ -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol*, 118: 275-281

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004): S 100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 1; 322 (4): 1111-22

McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ (2003): Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1 $\beta$  stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44; 5: 1859-1865

Menzies BE und Kenoyer A (2006): Signal transduction and nuclear responses in *Staphylococcus aureus*-induced expression of human  $\beta$ -Defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect Immun*, 74: 6847-6854

Miescher G (1960): On the diagnosis and therapy of melanoma. *Oncologia*, 13: 164-183

Nitschke M, Wiehl S, Baer PC, Kreft B (2002): Bactericidal activity of renal tubular cells: the putative role of human  $\beta$ -defensins. *Exp Nephrol*, 10: 332-337

Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DYM (2003): Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, 171: 3262-3269

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, Ng W, Sayama K, Hashimoto K, Nagaoka I, Okumura K, Ogawa H (2007): Antimicrobial peptides human  $\beta$ -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. J Invest Dermatol, 127: 594-604

Ogawa H, Miyazaki H, Kimura M (1971): Isolation and characterization of human skin lysozyme. J Invest Dermatol, 57; 2: 111-116

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DYM (2002): Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Engl J Med, 347; 15: 1151-1160

Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G (2008): The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. J Invest Dermatol, 128: 1365-1374

Quinones-Mateu ME, Lederman MM, Feng Z, Chakraborty B, Weber J, Rangel HR, Marotta ML, Mirza M et al. (2003): Human epithelial  $\beta$ -defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. AIDS, 17; 16: F39-F48

Royuela M, Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, Paniagua R (2008): TNF- $\alpha$ /IL-1/NF- $\kappa$ B transduction pathway in human cancer prostate. Histol Histopathol, 23: 1279-90

Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayama S, Kirkwood KL, Gaffen SL (2004): Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. J Biol Chem, 279; 4: 2559-2567

Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schröder J, Podschun R (2003): *Burkholderia* is highly resistant to human beta-defensin 3. Antimicrob Agents Chemother, 47; 5: 1739-1741

Sambrook J und Gethin MJ (1989): Protein structure. Chaperones, paperones. Nature, 342: 224-225



Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC (2005): Human defensins. *J Mol Med*, 83: 587-595

Scheynius A, Fransson J, Johansson C, Hammar H, Baker B, Fry L, Valdimarsson H (1992): Expression of interferon-gamma receptors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol*, 98: 255-258

Schröder JM (1999): Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol*, 57: 121-134

Schröder JM und Harder J (1999): Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 645-651

Schröder JM (2002): Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan. *Der Hautarzt*, 53: 424-435

Schröder JM und Harder J (2006): Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63; 4: 469-486

Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL (2005): Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha- induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol*, 77: 388-99

Simanski M, Schumacher H, Harder J (2009): Abstract: The synergistic action of interferon-gamma and interleukin-17 increases cutaneous innate immunity by the induction of antimicrobial proteins. *J Invest Dermatol*, 129; Suppl. 2: 14

Simanski M, Schumacher H, Gläser R, Harder J (2010): The synergistic action of IFN-γ and IL-17 increases cutaneous innate immunity by the induction of antimicrobial proteins. *J Innate Immun*. In Revision.

Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004): Cyclooxygenase isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56; 2: 387-437

Singh G und Rao DJ (1978): Bacteriology of psoriatic plaques. *Dermatologica*, 157: 21-27

Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BAD, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. (1998): Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 14961-14966

Sörensen OE, Cowland JB, Theilgaard-Mönch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N (2003): Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol*, 170: 5583-5589

Sörensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T (2005): Differential regulation of (beta)-defensin expression in human skin by microbial stimulation. *J Immunol*, 174: 4870-4879

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho S, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA (2006): Human  $\beta$ -defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 66; 17: 8542-8549

Takahashi H, Asano K, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (1999): Interferon-gamma dependent stimulation of human involucrin gene expression: STAT1 (signal transduction and activators of transcription1) protein activates involucrin promoter activity. *Biochem J*, 3: 797-802

Teunissen MBM, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD (1998): Interleukin-17 and interferon- $\gamma$  synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 111; 4: 645-649

Van Beelen AJ, Teunissen MBM, Kapsenberg ML, de Jong EC (2007): Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 7: 374-381

- Varoga D, Pufe T, Harder J, Schröder JM, Mentlein R, Meyer-Hoffert U, Goldring MB, Tillmann B, Hassenpflug J, und Paulsen F (2005): Human  $\beta$ -defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis Rheum*, 52; 6: 1736-1745
- Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF (2004): NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun*, 72; 10: 5750-5758
- Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schröder JM, und Harder J (2006): *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1 $\beta$ -mediated induction of human  $\beta$ -defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Inv Derm*, 126: 121-127
- Weinberg AN und Swartz MN (2003): Bacterial diseases with cutaneous involvement. *In*: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen AZ, Freedberg IM, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (Hrsg.). *Dermatology in General Medicine*, 6<sup>th</sup> edition 2003, Mc Graw Hill, New York
- Wenghoefer M, Pantelis A, Dommisch H, Götz W, Reich R, Bergé S, Martini M, Allam JP, Jepsen S, Merkelbach-Bruse S, Fischer HP, Novak N, Winter J (2008): Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumors. *BMC Cancer*, 8: 290
- Williams IR, Rich BE, Kupper TS (2003): Cytokines. *In*: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen AZ, Freedberg IM, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (Hrsg.). *Dermatology in General Medicine*, 6<sup>th</sup> Edition 2003, Mc Graw Hill, New York
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W (2003): Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. *Proc Natl Acad Sci*, 100; 15: 8880-8885

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ (1999):  $\beta$ -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, 286: 525-528

Yu JJ und Gaffen SL (2008): Interleukin-17: A novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci*, 13, 170-177

Zasloff M (1988): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 5449-5453.

Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF (2003): Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucl Acids Res*, 31; 2: 602-607

---

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Schröder und Prof. Dr. Harder für die Überlassung des Themas bedanken. Besonders Prof. Dr. Harder danke ich außerdem für die freundliche Betreuung, Unterstützung und viel Geduld.

Für eine hervorragende Einarbeitung, viele Tipps und Hilfestellungen für die Praxis und die offene Atmosphäre im Labor danke ich Bente, Eske, Maren, Heilwig, Elvira, und Christel.

Außerdem möchte ich mich bei allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Maïke und Jesko für viele fruchtbare Anregungen, Unterstützung und Motivation.

Abschließend möchte ich mich bei Marion, Jürgen und Jens bedanken, die besonders während des Studiums immer für mich da waren und mich in jeder Hinsicht immer unterstützt haben.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Hanna Maria Schumacher

Anschrift: Dreiweidenstraße 4  
65195 Wiesbaden

Geburtsdatum, -ort: 24.05.1982 in Düsseldorf

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Promotion:

Seit 05/2006 Klinik für Dermatologie an der CAU Kiel im SFB 617  
(Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Harder)

### Berufliche Tätigkeiten:

Seit 01.10.2009 Assistenzärztin im Institut für Klinische Chemie  
und Laboratoriumsmedizin, Universitätsmedizin  
Mainz

### Studium:

04.06.2009 Bestehen der 2. Ärztlichen Prüfung

04/2005- 06/2009 Studium der Humanmedizin an der  
Christian-Albrechts-Universität Kiel

23.03.2005 Bestehen der 1. Ärztlichen Prüfung

10/2001- 04/2005 Studium der Humanmedizin an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Schule:

13.06.2001 Allgemeine Hochschulreife

08/1993-06/2001 Gesamtschule Monheim, Monheim am Rhein

---

Hanna Maria Schumacher

---

**Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit:**

Simanski M, Schumacher H, Harder J (2009): Abstract: The synergistic action of Interferon-gamma and Interleukin-17 increases cutaneous innate immunity by the induction of antimicrobial proteins. J Invest Dermatol 129; Suppl. 2: 14

Simanski M, Schumacher H, Harder J (2009): Abstract: The synergistic action of Interferon-gamma and Interleukin-17 increases cutaneous innate immunity by the induction of antimicrobial proteins. Exp Dermatol 18: 302

Simanski M, Schumacher H, Gläser R, Harder J (2010): The synergistic action of IFN- $\gamma$  and IL-17 increases cutaneous innate immunity by the induction of antimicrobial proteins. Journal of Innate Immunity, in Revision.